

527,785

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. April 2004 (01.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/027062 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/11,
A61K 38/00, C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003028

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. September 2003 (12.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 42 319.9 12. September 2002 (12.09.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): AVONTEC GMBH [DE/DE]; Humboldtallee
23, 37073 Göttingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CATTARUZZA,
Marco [DE/DE]; Försterweg 5, 37077 Göttingen (DE).
HECKER, Markus [DE/DE]; Henri-Dunant-Str. 44d,
37075 Göttingen (DE).

(74) Anwälte: BETTENHAUSEN, Berthold usw.; Dehmel &
Bettenhausen, Patentanwälte, Herzogspitalstr. 11, 80331
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: FUNCTIONAL CORRECTION OF THE ⁻⁷⁸⁶C/T VARIANCE OF THE HUMAN *ENOS* GENE

(54) Bezeichnung: FUNKTIONELLE KORREKTUR DER ⁻⁷⁸⁶C/T-VARIANZ DES HUMANEN *ENOS*-GENS

-871 CTGGTGTACCCACCTGCATTCTGGGA⁻⁷⁸⁶ACTGTAGTTCCCTAGTCCCCCA

STAT

T

-821 TGCTCCCACCAGGGCATCAAGCTCTTCCCTGGCCGGCTGACCC⁻⁷⁸⁶IGCCTCA

-786

c-Jun

(57) Abstract: The invention relates to decoy oligonucleotides having the nucleic acid sequence according to SEQ ID Nos. 1 to 34 and to their use as medicaments. The invention also relates to a method for diagnosing the ⁻⁷⁸⁶C/T variance in the *eNOS* gene.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Decoy-Oligonukleotide mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 34 sowie deren Verwendung als Arzneimittel. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Diagnose der ⁻⁷⁸⁶C/T-Varianz im *eNOS*-Gen.

WO 2004/027062 A2

5

Funktionelle Korrektur der $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz des humanen *eNOS*-Gens

Die vorliegende Erfindung betrifft Decoy-Oligonukleotide mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 34 sowie deren Verwendung als Arzneimittel. Ferner betrifft die vorliegende
10 Erfindung ein Verfahren zur Diagnose der $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz im *eNOS*-Gen.

Ein wesentliches Ziel der Dechiffrierung des menschlichen Genoms ist es, krankmachende Gene (aufgrund der Wirkungsweise ihrer Produkte) bzw. krankmachende Veränderungen in der Struktur dieser Gene (Polymorphismen) zu identifizieren und einem Krankheitsbild zuzuordnen.
15 Damit rückt die Kausaltherapie einer Vielzahl von Erkrankungen in greifbare Nähe, wenn man akzeptiert, dass diese durch eine definierte Anzahl von zu stark, zu schwach oder fehlerhaft exprimierten Genprodukten verursacht sind. Während für bestimmte Erbkrankheiten (z.B. Mukoviszidose) der in der Regel singuläre Gendefekt (monogenetische Erkrankung) bereits bekannt ist, stellt sich die Situation für polygenetische Erkrankungen (z.B. Atherosklerose)
20 wesentlich komplexer dar. So prädestiniert zwar das Zusammentreffen verschiedener Gendefekte die betroffenen Personen für die Erkrankung, diese entwickelt sich aber erst bei Exposition gegenüber bestimmten Umweltfaktoren. Ungeachtet dessen bietet der gezielte Eingriff in die Expression eines oder mehrerer Gene auch bei polygenetischen Erkrankungen die Chance einer ursachen- und nicht lediglich symptombezogenen Therapie.

25

Die Atherosklerose mit ihren primären Folgeerkrankungen Herzinfarkt, Herz- und Niereninsuffizienz sowie dem Schlaganfall ist in den Industrienationen für mehr als 50% aller Todesfälle verantwortlich, wobei diese Tendenz weiter zunimmt. Im Jahr 2020 werden Atherosklerose-bedingte Herz-Kreislaufferkrankungen, nicht zuletzt aufgrund der steigenden
30 Lebenserwartung, weltweit die häufigste Todesursache darstellen. Neben der vermuteten genetischen Prädisposition zählen Bluthochdruck, Hypercholesterolämie, Rauchen und Diabetes (Typ I und II) zu den primären Risikofaktoren der Atherosklerose. Diese können mit Ausnahme der Prädisposition und dem (Zigaretten)Rauchen medikamentös behandelt werden, wobei diese Behandlung in der Regel erst dann einsetzt, wenn die betroffenen Personen symptomatisch
35 geworden sind, d.h. bereits manifeste atheromatöse Plaques in den Wänden der Arterien,

insbesondere der Herzkranzgefäße, der Karotiden und Cerebralgefäße sowie den Nierengefäßen aufweisen. Oft bleibt als Therapieoption zur Vermeidung eines zerebralen, myokardialen oder renalen Infarktes nur die Aufdehnung der blockierten Arterien mit Hilfe eines Ballonkatheters mit und ohne anschließende Platzierung einer Gefäßstütze (Stent) oder die Bypass-Operation, bei der die blockierte Arterie mit Hilfe eines autologen Arterien- oder Venensegments umgangen wird. Ein Problem dieser Eingriffe ist neben der hohen Wiederverschlussrate des behandelten Gefäßes (circa 30% für den Ballonkatheter/Stent nach 6-12 Monaten und circa 50% für den aortokoronaren Venenbypass nach 1-5 Jahren) die Tatsache, dass es sich bei der Atherosklerose um eine systemische Grunderkrankung handelt, die sich jederzeit in einem zuvor noch nicht betroffenen Gefäßabschnitt manifestieren kann.

Ein noch größeres medizinisches Problem stellen, weniger im Hinblick auf die Mortalität sondern vielmehr die hiermit assoziierte Morbidität und die unter Umständen lebenslange Therapie betreffend, chronische Entzündungs- bzw. Autoimmunerkrankungen dar. Darüber hinaus verursachen die bei diesem Patientenkreis in der Regel systemisch verabreichten, stark wirksamen Entzündungshemmer wie Glukokortikoide (z.B. Prednison), Immunsuppressiva (z.B. Cyclosporin A) und Antimetabolite (z.B. Azathioprin) zum Teil gravierende Nebenwirkungen. Hierzu zählen insbesondere Myelotoxizität, Neurotoxizität, Nephrotoxizität, Stoffwechselstörungen bis hin zur Induktion eines Diabetes mellitus, arterieller Hypertonus, Infektionen und Malignome. Beispielsweise entwickeln 25% der Patienten mit rheumatoider Arthritis, die mit dem Zytostatikum Methotrexat behandelt werden, innerhalb von 2 Jahren eine schwere Leberzirrhose. Zu den zahlenmäßig bedeutendsten, chronischen Entzündungs- bzw. Autoimmunerkrankungen zählen die chronisch obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem (zusammengefasst als chronisch obstruktive Lungenerkrankungen oder COPD; Prävalenz in Deutschland 4-7%), die Schuppenflechte (Psoriasis; 2-3%), die rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthritis; 0,8%) und der Insulin-abhängige Diabetes mellitus (Typ I; 0,5%). Diesen Erkrankungen liegt, mutmaßlich auf dem Boden verschiedener genetischer Prädispositionen, eine Immunregulationsstörung im Sinne einer übermäßigen Aktivierung von T-Helferzellen des Typs 1 (Th1) zugrunde.

Auch in der Pathogenese der Atherosklerose spielt die Infiltration dieser Immunzellen in die Gefäßwand eine wichtige Rolle. Weitere Beispiele für eine Überaktivierung von Th1-Zellen sind

die Transplantatabstoßung, die Kontaktdermatitis sowie persistierende Folgeerkrankungen bakterieller oder viraler Infektionen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde Mittel für eine Prävention, Therapie oder Diagnostik der genannten Erkrankungen zur Verfügung zu stellen. Die Aufgabe wird durch den in den Patentansprüchen definierten Gegenstand gelöst.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren näher erläutert:

Figur 1 zeigt die Sequenz des humanen Stickstoffmonoxid(NO)-Synthase(eNOS)-Gens im Bereich der T zu C Transition an Position -786. Die unterstrichenen Basen kennzeichnen die Konsensusbindungsstellen für zwei bekannte Transkriptionsfaktoren.

Figur 2 zeigt in Balkendiagrammen die fehlende Stimulierbarkeit der eNOS-Expression auf (A) mRNA (n=8-12) und (B) Proteinebene (n=3) in kultivierten Endothelzellen, die aus der Nabelschnurvene von Spendern mit ⁻⁷⁸⁶C/C-Genotyp isoliert worden waren, im Vergleich zu Endothelzellen von Spendern mit ⁻⁷⁸⁶C/T und insbesondere ⁻⁷⁸⁶T/T-Genotyp. Dargestellt ist die prozentuale Steigerung der Expression in Zellen, die für 24 Stunden (mRNA) bzw. 36 Stunden (Protein) in einem Kegel-Platte-Viskosimeter einer Wandschubspanung (WSS) von 30 dyn/cm² ausgesetzt worden waren, im Vergleich zu Zellen desselben Spenders, die für diesen Zeitraum unter statischen Bedingungen inkubiert wurden (*P<0,05 im Vergleich zur statischen Kontrolle).

Figur 3 zeigt in einem Balkendiagramm die Wiederherstellung der Schubspannungsinduktion der eNOS-Expression in kultivierten Endothelzellen von Spendern mit ⁻⁷⁸⁶C/C-Genotyp, die für 4 Stunden mit einem C-Typ (SEQ ID NO:1) nicht aber mit einem T-Typ-Allel Decoy-Oligonukleotid (SEQ ID NO:3) vorbehandelt worden waren (Konzentration im Medium von 10 µmol/l). Dargestellt ist die prozentuale Steigerung der mRNA-Expression in Zellen, die für 24 Stunden in einem Kegel-Platte-Viskosimeter einer Wandschubspanung (WSS) von 30 dyn/cm² ausgesetzt worden waren, im Vergleich zu Zellen desselben Spenders, die für diesen Zeitraum unter statischen Bedingungen inkubiert wurden (n=4; *P<0,05 im Vergleich zur statischen Kontrolle).

Figur 4 (A) zeigt in einer graphischen Darstellung und einer repräsentativen Western Blot-

Analyse die zeitabhängige Induktion der eNOS-Expression auf mRNA (statistische Zusammenfassung, n=3-10, *P<0,05 vs. nicht stimulierte Zellen) und Proteinebene durch IL-10 (2 ng/ml) in kultivierten Endothelzellen von Spendern mit ⁻⁷⁸⁶T/T-Genotyp, die zuvor 9 Stunden mit Vitamin D3 (10 nmol/l) vorbehandelt worden waren, um die Expression des IL-10 Rezeptors zu stimulieren. Fig. 4 (B) zeigt in einem Balkendiagramm die fehlende Induktion der eNOS-Expression durch IL-10 unter ansonsten identischen experimentellen Bedingungen in kultivierten Endothelzellen von Spendern mit ⁻⁷⁸⁶C/C-Genotyp (statistische Zusammenfassung, n=6, *P<0,05 vs. nicht stimulierte Zellen).

Figur 5 zeigt in Balkendiagrammen die Auswirkungen der IL-10 (2 ng/ml) induzierten verstärkten eNOS-Expression auf die CD154-stimulierte (2×10⁵ Maus-Myelomzellen/ml) *de novo* Synthese von IL-12 p40 auf (A) mRNA und (B) Proteinebene über 6 Stunden in IL-10 Rezeptor-exprimierenden kultivierten Endothelzellen von Spendern mit ⁻⁷⁸⁶T/T bzw. ⁻⁷⁸⁶C/T-Genotyp sowie deren Modulation mittels Blockade der eNOS-Aktivität durch Nitroarginin. Statistische Zusammenfassungen der RT-PCR-Analysen (mit rpl32 als internem Standard; n=6) und ELISA-Daten (n=6-10; *P<0,05 vs. CD154-stimulierte Kontrollzellen).

Figur 6 zeigt in einem Balkendiagramm die fehlende Hemmung der CD154-stimulierten IL-12 p40-Expression in IL-10 Rezeptor-exprimierenden kultivierten Endothelzellen von Spendern mit ⁻⁷⁸⁶C/C-Genotyp sowie deren Restaurierung durch Vorbehandlung der Zellen (4 Stunden, 10 µmol/l) mit dem C-Typ-Allel Decoy-Oligonukleotid (SEQ ID NO: 5). Statistische Zusammenfassung der RT-PCR-Analysen (mit rpl32 als internem Standard; n=7-15, *P<0,05 vs. CD154-stimulierte Kontrollzellen).

Figur 7 zeigt in graphischen Darstellungen exemplarisch die Ergebnisse der für die Genotypisierung entwickelten Echtzeit-PCR/Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET)/DNA-Schmelzkurven-Analytik für die drei Varianten des ⁻⁷⁸⁶C/T-Polymorphismus des humanen eNOS-Gens.

Figur 8 zeigt schematisch zwei Varianten der Echtzeit-PCR/FRET/DNA-Schmelzkurven-Analytik zur Diagnose der ⁻⁷⁸⁶C/T-Varianz im eNOS-Gen. Die eingekreisten Zahlen stehen für die SEQ ID NO der erfindungsgemäßen Anker- bzw. Detektionsproben (FL, Fluorescein; LC 640, LC-Red 640).

Der hier verwendete Ausdruck "Decoy-Oligonukleotid" oder "Cis-Element Decoy" bezeichnet ein doppelsträngiges DNA-Molekül, das eine Sequenz aufweist, die der natürlichen Kernbindungssequenz eines DNA-bindenden Proteins oder Proteinkomplexes im Genom entspricht oder ähnelt und an die das Protein oder der Proteinkomplex in der Zelle bindet. Das
5 Cis-Element Decoy wirkt im Sinne der vorliegenden Erfindung somit als Molekül zur kompetitiven Inhibierung (besser Neutralisierung) des Proteins oder Proteinkomplexes, das/der die Expression der *eNOS*, eines Gens mit einer nachgewiesenen wichtigen Schutzfunktion, bei Vorliegen des ⁻⁷⁸⁶C/C-Genotyps blockiert und somit prädisponierend für die Ausbildung der in
10 den Patentansprüchen definierten Erkrankungen und Komplikationen wirkt.

Der hier verwendete Begriff "C/T-Varianz" bezeichnet das Vorliegen einer heterozygoten oder homozygoten T zu C Transition an Position -786 des humanen *eNOS*-Gens. Demzufolge ist der hier verwendete Begriff "C/C-Genotyp" die homozygote T zu C Transition und der C/T-Genotyp
15 die heterozygote T zu C Transition.

Die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Endothelzellen der Gefäßwand spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Organdurchblutung und in der Aufrechterhaltung der Gefäßwandintegrität. Die letztgenannte Wirkung von NO beruht insbesondere auf der Hemmung
20 der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Darüber hinaus inhibiert NO die Expression von Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen im Endothel. Hierdurch wird bei entzündlichen Prozessen die Rekrutierung, Aktivierung und Transmigration von im Blut zirkulierenden Leukozyten unterdrückt. Insofern wird NO u. a. eine wichtige Rolle in der Prävention der Atherosklerose zugeschrieben, die nach heutigem Verständnis eine chronisch rezidivierende
25 Entzündungserkrankung der Gefäßwand darstellt.

Die NO-Bildung in den Endothelzellen wird von der so genannten endothelialen NO-Synthase (eNOS) katalysiert, der physiologisch wichtigste Reiz für die Aktivität des Enzyms ist eine Veränderung der Wandschubspannung. Das ist die durch das strömende Blut auf die
30 Endothelzellen, welche die Arterien und Venen innen auskleiden, ausgeübte visköse Zugspannung. So führt ein Anstieg der Wandschubspannung, ausgelöst durch eine Konstriktion des Blutgefäßes oder einen Anstieg des Blutflusses, zu einer Steigerung der NO-Synthaseaktivität und infolgedessen zu einer NO-vermittelten Vasodilatation, d.h. Zunahme der

Organdurchblutung. Neben dieser akuten Änderung der Enzymaktivität führt ein Anstieg der Wandschubspannung mittelfristig auch zu einer verstärkten Expression der NO-Synthase in den Endothelzellen. Bedingt durch die ständigen lokalen Änderungen der Wandschubspannung ist die schubspannungsinduzierte Induktion (besser Aufrechterhaltung) der NO-Synthase-Expression von entscheidender Bedeutung für die NO-Synthesekapazität des Gefäßendothels und damit für die strukturelle und funktionelle Integrität der Gefäßwand (Gimbrone et al. (2000) Ann. N. Y. Acad. Sci. 920, 230).

Interleukin-10 (IL-10) ist ein wichtiges anti-inflammatorisches Zytokin bei chronisch rezidivierenden Entzündungserkrankungen wie z.B. Psoriasis, rheumatoide Arthritis oder Morbus Crohn, die durch eine übermäßige Aktivierung von T-Helferzellen des Typs 1 verursacht sind (Moore et al. (2001) Annu. Rev. Immunol. 19, 683). Auch in der Pathogenese der Atherosklerose spielt die Infiltration und Aktivierung von Th1-Zellen in der Gefäßwand eine wichtige Rolle (Daugherty und Rateri (2002) Circ. Res. 90, 1039). IL-10 hemmt die Bildung von IL-12 in den mit den Th1-Zellen kommunizierenden antigenpräsentierenden Zellen. Hierzu zählen insbesondere dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen; aber auch Endothelzellen sind in der Lage die für die Antigenpräsentation benötigten MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche zu exprimieren und biologisch aktives IL-12 freizusetzen. IL-12 selbst ist der wichtigste Faktor für die Differenzierung von naiven T-Helferzellen zu Th1-Zellen und stimuliert deren Proliferation (klonale Expansion). Interessanterweise kann die Synthese von IL-12 in humanen Endothelzellen nur nach Kostimulation über das CD40-Rezeptor/CD40-Ligand-System induziert werden (Lienenlücke et al. (2000) Eur. J. Immunol. 30, 2864). Hierbei exprimieren die Endothelzellen in der Regel den Rezeptor (CD40) und aktivierte Th1-Zellen den CD40-Ligand (auch als CD154 bezeichnet).

Das humane *eNOS*-Gen weist eine Reihe von Polymorphismen auf, bei denen eine einzelne Base ausgetauscht ist (SNP für *single nucleotide polymorphism*), so auch eine T zu C Transition im Promoter des Gens an Position -786 (Figur 1). Linkage-Analysen belegen, dass dieser Basenaustausch nicht isoliert vorkommt, sondern stets mit einer A zu G Transition an Position -922 und einer T zu A Transition an Position -1486 assoziiert ist. Die funktionelle Bedeutung dieser Polymorphismen ist mit Ausnahme der T zu C Transition an Position -786, die nun von den Erfindern aufgeklärt wurde, bisher nicht bekannt (Wattanapitayakul et al. (2000) Trends Pharmacol. Sci. 22, 361). Bemerkenswert ist, dass in Westeuropa ebenso wie in der

5 kaukasischen Bevölkerung Nordamerikas 12-15% homozygote Träger der ^{-786}C -Variante sind, d.h. sie weisen den Genotyp $^{-786}\text{C/C}$ auf. Circa 48% sind heterozygot für diesen SNP, d.h. sie weisen den Genotyp $^{-786}\text{C/T}$ auf und circa 38% sind homozygote Träger der ^{-786}T -Variante, d.h. sie weisen den Genotyp $^{-786}\text{T/T}$ auf. Weiterhin interessant ist, dass diese Mutation bei anderen Säugetieren (Hund, Maus, Ratte und Rind) offenbar nicht vorkommt, da an der entsprechenden Position im *eNOS*-Promoter dieser Spezies eine Base fehlt.

10 Unter dem Begriff koronare Herzkrankheit, kurz KHK, versteht man die in den Herzkranzgefäßen (Koronararterien) gebildete (manifeste) Atherosklerose, die zu einer fortschreitenden Verengung der betroffenen Gefäße führt. Folgen dieser Durchblutungsstörung in den Herzkranzgefäßen sind (nach Schweregrad in aufsteigender Reihenfolge) die stabile Angina pectoris (durch die Bildung von Umgehungsarterien, so genannten Kollateralen, wird die Atherosklerose-bedingte Durchblutungsstörung zumindest teilweise kompensiert, die Patienten werden nur bei körperlicher Belastung symptomatisch z.B. Auftreten von Brustschmerzen), die
15 instabile Angina pectoris (durch Blutgerinnsel (Thrombosen) verursachte zunehmende Gefäßeinengung, die Patienten haben bereits in Ruhe Brustschmerzen, circa 25% von ihnen erleiden innerhalb von 4 Wochen einen Myokardinfarkt), der Myokardinfarkt selbst (Totalverschluss einer Herzkranzarterie durch ein Blutgerinnsel) sowie der plötzliche Herztod (schwere Durchblutungsstörungen durch Akutverschluss einer oder mehrerer Herzkranzgefäße mit Herzrhythmusstörungen, die zum Herzstillstand führen). Die koronare Herzkrankheit und die
20 durch sie ausgelöste Koronarinsuffizienz (durch die Mangel durchblutung hervorgerufene Unterversorgung des Herzmuskels mit Sauerstoff) ist auch primär verantwortlich für die Ausprägung einer Herzmuskelschwäche (Herzinsuffizienz). Insofern stellt die koronare Herzkrankheit nach wie vor die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar.
25 Insofern kommt der Aufdeckung von genetischen Risikofaktoren für die Entwicklung der koronaren Herzkrankheit eine große sozioökonomische Bedeutung zu.

Die sehr seltene spontane Verkrampfung einer oder mehrerer Herzkranzgefäße (auch als Koronarspasmus, vasospastische Angina pectoris oder Prinzmetal-Angina bezeichnet)
30 unterscheidet sich von der KHK insofern, dass die spontane Verkrampfung die Extremform einer dynamischen Koronarstenose (exzentrische Stenose mit Konstriktion der plaquefreien Gefäßwand) bei Patienten mit instabiler Angina pectoris darstellt. Patienten mit vasospastischer Angina pectoris sind oft Raucher und haben meist noch andere vaskuläre Phänomene (Migräne,

Morbus Raynaud). Die Pathogenese der vasospastischen Angina pectoris ist noch nicht geklärt. Vermutet wird eine Beteiligung des autonomen Nervensystems.

Die Erfinder haben überraschenderweise gefunden, dass Träger des $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyps des *eNOS*-Gens – unabhängig von den anderen primären Risikofaktoren für die Atherosklerose in den Herzkranzgefäßen, d.h.. Bluthochdruck, Hypercholesterolämie, Rauchen und Diabetes – von einer rascheren Progredienz der koronaren Herzkrankheit betroffen sind (Tabelle 1). So weisen 19,0% der KHK-positiven Patienten den $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyp auf, -aber nur 4,4% der KHK-negativen Patienten; die Häufigkeit des $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyps in der Kontrollpopulation beträgt 11,8%. Demzufolge haben diese Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko, frühzeitig einen unter Umständen tödlichen Herzinfarkt zu erleiden. Der Grund für die raschere Manifestierung der Atherosklerose bei den homozygoten Trägern des Gendefekts ist eine verminderte NO-Synthesekapazität der Endothelzellen.

So konnten die Erfinder nachweisen, dass in kultivierten Endothelzellen, die aus der Nabelschnurvene von Spendern mit dem $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyp isoliert worden waren, die typische durch eine Erhöhung der Wandschubspannung hervorgerufene Steigerung der eNOS-Expression auf mRNA- ebenso wie auf Proteinebene ausbleibt (Figur 2). Die mittels konventioneller RT-PCR erhaltenen Daten für die Expression der eNOS mRNA konnten mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse vollumfänglich bestätigt werden (T/T-Genotyp $454 \pm 27\%$ der statischen Kontrolle, $P < 0,05$; C/T-Genotyp $278 \pm 27\%$, $P < 0,05$; C/C-Genotyp $116 \pm 26\%$; $n = 8-12$). In Endothelzellen von Spendern mit dem $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyp konnte dagegen eine deutliche Zunahme der eNOS-Expression durch Erhöhung der Wandschubspannung ausgelöst werden, wenn die Zellen mit einem 22 bp langen Decoy-Oligonukleotid, welches dem C-Typ (SEQ ID NO: 1) nicht aber dem T-Typ-Allel (SEQ ID NO: 3) des *eNOS*-Gens entspricht, vorbehandelt wurden (Figur 3). Auch diese mittels konventioneller RT-PCR erhobenen Befunde konnten mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR-Analyse vollumfänglich bestätigt werden (WSS $117 \pm 27\%$ der statistischen Kontrolle; WSS plus C-Typ Decoy-Oligonukleotid $324 \pm 30\%$, $P < 0,05$; WSS plus T-Typ Decoy-Oligonukleotid $133 \pm 47\%$; $n = 4$).

Die Transkription wird von Proteinen gesteuert, die sich an die Starterregion eines Gens (Promotorregion) binden. Die korrekte Zusammenlagerung mehrerer dieser Transkriptionsfaktoren (Transkriptosom) bewirkt eine Aktivierung der RNA-Polymerase und

initiiert die Transkription. Andererseits kann die Bindung eines falschen Transkriptionsfaktors die Bildung des Transkriptosoms verhindern und damit die Expression des Gens blockieren. Decoy-Oligonukleotide imitieren das Sequenzmotiv, an welches sich der Ziel-Transkriptionsfaktor in der Starterregion seines (seiner) Zielgens (Zielgene) bindet, und
5 neutralisieren diesen. Infolgedessen wird die durch diesen Transkriptionsfaktor vermittelte Induktion bzw. Repression der Transkription verhindert.

In V. saphena-Segmenten von Patienten, die sich einer aortokoronaren Bypass-Operation unterziehen mussten, zeigte sich des weiteren, dass die endothelabhängige NO-vermittelte
10 Vasodilatation bei Individuen mit $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyp ($n=13$), unabhängig von dem Vorhandensein der primären Risikofaktoren für die Atherosklerose, deutlich schwächer ausgeprägt ist (Maximalantwort auf Acetylcholin um 35% vermindert, $P<0,05$) als bei Trägern der beiden anderen Genotypen ($n=41$ bzw. 45). Dieser Befund stützt die Hypothese, dass die mangelnde schubspannungsinduzierte Aufrechterhaltung der eNOS-Expression bei den homozygoten
15 Trägern des Gendefekts die NO-Synthesekapazität des Gefäßendothels limitiert und insofern der Manifestation der Atherosklerose Vorschub leistet.

Ferner haben die Erfinder gefunden, dass humane Endothelzellen nach Exposition gegenüber verschiedenen pro-inflammatorischen Zytokinen, d.h. unter (simulierten)
20 Entzündungsbedingungen, ebenso wie nach Behandlung mit Vitamin D3, den Rezeptor für IL-10 exprimieren. Die Stimulation des Rezeptors, d.h. Inkubation der IL-10 Rezeptor exprimierenden Zellen mit IL-10, resultierte in einer deutlichen Steigerung der eNOS-Expression in den Endothelzellen (Figur 4); ein Effekt, der mit Hilfe von elektrophoretischen Mobilitätsshift-Analysen und dem Einsatz entsprechender Decoy-Oligonukleotide auf die Aktivierung des
25 Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-3 zurückgeführt werden konnte. Eine funktionelle Konsequenz dieser IL-10-vermittelten Steigerung der eNOS-Expression war die Hemmung der CD154-induzierten Neusynthese von IL-12 in den Endothelzellen (Figur 5), die NO-sensitiv ist (Modulation durch den NO-Synthase-Inhibitor Nitroarginin). Demnach kann IL-10 seine anti-inflammatorische Wirkung bei Th1-gewichteten
30 chronischen Entzündungserkrankungen, insbesondere die Hemmung der IL-12-Synthese in den Endothelzellen, durch eine Steigerung der eNOS-Expression und der damit assoziierten verstärkten NO-Bildung entfalten.

Die für den IL-10-Effekt wichtige STAT-Bindungsstelle im Promoter des humanen *eNOS*-Gens liegt circa 60 Basenpaare oberhalb der T zu C Transition an Position -786. Die Erfinder konnten zeigen, dass der ⁻⁷⁸⁶C/T-Polymorphismus einen Effekt auf die Induzierbarkeit der eNOS-Expression durch IL-10 hat. So kam es in Endothelzellen von Spendern mit ⁻⁷⁸⁶C/C-Genotyp

5 – trotz Vitamin D3-Induktion der IL-10 Rezeptor-Expression – zu keiner Steigerung der eNOS-Expression durch IL-10 (Figur 4). Darüber hinaus hemmte die IL-10-Exposition die CD154-induzierte Synthese von IL-12 in diesen Zellen nicht, sondern verstärkte diese sogar (Figur 6). Bedingt durch die räumliche Nähe kommt es zu einer Hemmung der Bildung des Transkriptosoms im Bereich der STAT-Bindungsstelle durch den an Position -786 bindenden

10 inhibitorischen Transkriptionsfaktor. Experimentelle Daten belegen, dass dieses Defizit, d.h. die fehlende Induktion der eNOS-Expression durch IL-10 und infolgedessen die fehlende IL-10-vermittelte Hemmung der IL-12-Synthese, durch Vorbehandlung der Endothelzellen mit dem zuvor beschriebenen C-Typ-Allel Decoy-Oligonukleotid (SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 5) vollständig kompensiert werden kann (Figur 6).

15 Eine weitere vergleichende Genotypisierung im Zusammenhang mit der fehlenden Induzierbarkeit der eNOS-Expression durch IL-10 zeigt, dass kaukasische Patienten mit rheumatoider Arthritis eine deutlich höhere Prävalenz des ⁻⁷⁸⁶C/C-Genotyps aufweisen als in der Normalbevölkerung (17,0% im Vergleich zu 11,8%, Tabelle 2). Bei diesen Patienten kann beispielsweise die intraartikuläre Applikation eines Decoy-Oligonukleotids während des

20 Entzündungsschubs die endogene IL-10-vermittelte Hemmung der Th1-Zellantwort nachhaltig verstärken bzw. erst ermöglichen und so den Entzündungsprozess und die damit assoziierte Knorpeldestruktion im betroffenen Gelenk abschwächen. Auch für andere Th1-gewichtete chronische Entzündungserkrankungen wie dem Morbus Crohn zeigt sich eine in der Tendenz deutlich höhere Prävalenz des ⁻⁷⁸⁶C/C-Genotyps (Tabelle 2). Bei Erkrankungen dieses Typs

25 liefert die systemische Applikation eines liposomal verpackten Decoy-Oligonukleotids wahrscheinlich den größtmöglichen therapeutischem Nutzen. Weitere Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich bei den in den Patentansprüchen zusätzlich definierten Erkrankungen bzw. Komplikationen, wobei Atemwegserkrankungen insbesondere einer inhalativen Therapie mit den erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotiden, Hauterkrankungen

30 insbesondere einer topischen Therapie und explantierte Organe bzw. Blutgefäße einer Inkubationsbehandlung *ex vivo*, d.h. außerhalb des Empfängerorganismus, zugänglich sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Bereitstellung eines Decoy-Oligonukleotids, das in

der Lage ist, sequenzspezifisch an ein Protein oder einen Proteinkomplex (im nachfolgenden als "Transkriptionsfaktor" oder "inhibitorischer Transkriptionsfaktor" bezeichnet) zu binden. Die Sequenz des Decoy-Oligonukleotids, das zur Verhinderung der Bindung des inhibitorischen Transkriptionsfaktors verwendet wird, ist die Sequenz, an die der Transkriptionsfaktor im Promoter des *eNOS*-Gens bindet. Das erfindungsgemäße Cis-Element Decoy weist folgende 10-mer Konsensus-Kernbindungssequenz auf: 5'-CTBBCYGBCT-3' (SEQ ID NO: 33) wobei Y=C oder T und B=C, G oder T bedeutet. Das Cis-Element Decoy kann ferner größer als die 10-mer Kernbindungssequenz sein und am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende verlängert werden. Entsprechende Mutationen im Bereich der Kernbindungssequenz (z.B. 5'-CTAGCTGACT-3') führen zu einem kompletten Verlust der Bindung des Transkriptionsfaktors an das Decoy-Oligonukleotid, sichtbar an der fehlenden biologischen Wirkung (Tabelle 3).

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Bereitstellung von Decoy-Oligonukleotiden, die in der Lage sind, sequenzspezifisch an den Transkriptionsfaktor zu binden und eine der folgenden Sequenzen haben, wobei hier nur jeweils ein Strang der Decoy-Oligonukleotide wiedergegeben ist und der komplementäre Strang ebenfalls umfasst ist:

- 5'-AGCTCTTCCCTGGCCGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 1),
- 5'-AGCTCTTCCCTGGCTGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 3),
- 5'-CTTCCCTGGCCGGCTGACCCTGC-3' (SEQ ID NO: 5),
- 5'-CTTCCCTGGCTGGCTGACCCTGC-3' (SEQ ID NO: 7),
- 5'-GCTCTTCCCTGGCCGGCTG-3' (SEQ ID NO: 9),
- 5'-CAAGCTCTTCCCTGGCCGG-3' (SEQ ID NO: 11),
- 5'-TCTTCCCTGGCCGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 13),
- 5'-CTGGCCGGCTGACCCTGCC-3' (SEQ ID NO: 15),
- 5'-TCCCTGGCCGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 17),
- 5'-CTGGCCGGCT-3' (SEQ ID NO: 19),
- 5'-CTGGCTGGCT-3' (SEQ ID NO: 21),
- 5'-TCCCTGGCYGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 23), wobei Y=C oder T bedeutet,
- 5'-CTGGCYGGCTGAC-3' (SEQ ID NO: 25), wobei Y=C oder T bedeutet,
- 5'-TCCCTBBCYGBCTGAC-3' (SEQ ID NO: 27) mit Y=C oder T und B=C, G oder T,
- 5'-CCCTBBCYGBCTG-3' (SEQ ID NO: 29) mit Y=C oder T und B=C, G oder T,
- 5'-CTBBCYGBCTGAC-3' (SEQ ID NO: 31) mit Y=C oder T und B=C, G oder T, und
- 5'-CTBBCYGBCT-3' (SEQ ID NO: 33) mit Y=C oder T und B=C, G oder T.

Insofern stellt die Verwendung der erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotide oder Cis-Element Decoys, die eine Konsensus-Kernbindungsstelle für den inhibitorischen Transkriptionsfaktor enthalten, das bevorzugte Verfahren zur spezifischen Inhibierung der Aktivität dieses Faktors dar. Die exogene Zufuhr einer großen Zahl von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zu einer Zelle, insbesondere in viel höherer Zahl als im Genom vorhanden, erzeugt eine Situation, in der die Mehrzahl eines bestimmten Transkriptionsfaktors spezifisch an das jeweilige Cis-Element Decoy und nicht an seine endogenen Ziel-Bindungsstellen bindet. Dieser Ansatz zur Inhibition der Bindung von Transkriptionsfaktoren an ihre endogene Bindungsstelle wird auch als Squenching bezeichnet. Squenching (oder auch Neutralisation genannt) von Transkriptionsfaktoren unter Verwendung von Cis-Element Decoys wurde u. a. erfolgreich bei Patienten eingesetzt, um ein übermäßiges Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen in aortokoronaren Venenbypassen zu inhibieren. Dabei wurden DNA-Fragmente verwendet, die spezifische Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor E2F enthalten (Mann et al. (1999) Lancet 354, 1493). Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur spezifischen Inhibierung der Aktivität des inhibitorischen Transkriptionsfaktors, der im Promotorbereich des eNOS-Gens an Position -786 bindet, umfassend den Schritt der Verabreichung eines Decoy-Oligonukleotids gemäß der vorliegenden Erfindung. Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotide als Arzneimittel.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotide zur Herstellung eines Arzneimittels, insbesondere zur Prävention oder Therapie der Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen (z.B. koronare Herzkrankheit mit Herzinfarkt und Herzinsuffizienz, zerebrale Durchblutungsstörungen mit Schlaganfall bzw. Multiinfarkt-Demenz sowie die periphere arterielle Verschlusskrankheit), chronischen Entzündungs- bzw. Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis (chronische Polyarthrit), Schuppenflechte einschließlich Psoriasis-Arthritis, allergisches Kontaktekzem und atopisches Ekzem (Neurodermitis), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (insbesondere Morbus Crohn und Colitis ulcerosa), Diabetes Typ I und II und deren Folgeerkrankungen (z.B. diabetische Nephropathie, Retinopathie und Vaskulopathie), der multiplen Sklerose, von Sarkoidosen, Kollagenosen und Vaskulitiden (einschließlich Glomerulonephritiden), der akuten und chronischen Abstoßung transplanterter Organe, der *graft versus host disease* (GVHD) sowie

dem Ischämie/Reperfusionsschaden von Organen im Anschluss an einen chirurgischen Eingriff, der Vaskulopathie von Venenbypässen, der (Prä-)Eklampsie bzw. schwangerschaftsinduzierten Hypertonie, der arteriellen Hypertonie und ihren Folgeerkrankungen (z.B. Linksherzhypertrophie, Aneurysmenbildung mit der Gefahr von Massenblutungen und dem Gefäßwandumbau von Arterien und Arteriolen), der pulmonalen Hypertonie, der chronischen Niereninsuffizienz, chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD), bakteriellen Infektionen und ihren Folgeerkrankungen (z.B. *Helicobacter pylori*-Gastritis, tuberkulöse Perikarditis, Lyme-Borreliose mit nachfolgender Borrelien-Arthritis bzw. Neuroborreliose), sowie postinfektiöse Komplikationen von Infektionen mit Cytomegalie-, Hepatitis B- und C-, Herpes- und HI (*human immunodeficiency*)-Viren wie z.B. portale Hypertonie und Fibrose bzw. opportunistische Infektionen, insbesondere *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie.

Abgesehen von der grundsätzlichen Voraussetzung, dass die erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotide den inhibitorischen Transkriptionsfaktor *in vitro* effektiv neutralisieren, ist es für die therapeutische Wirksamkeit entscheidend, dass das DNA-Molekül schnell und in einem ausreichenden Umfang in die Zielzelle aufgenommen wird. Darüber hinaus sollte das erfindungsgemäße Cis-Element Decoy eine bestimmte Länge nicht überschreiten, da dies für den Transport in die Zielzelle limitierend ist. Geeignet ist jedes Decoy-Oligonukleotid mit einer Länge von mindestens 10 bp (Konsensus-Kernbindungssequenz) bis zu einer Länge von etwa 30 bp, vorzugsweise bis zu einer Länge von etwa 27 Basenpaaren, besonders bevorzugt bis zu einer Länge von etwa 23, insbesondere bevorzugt mit einer Länge von 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 oder 23 Basenpaaren.

Da das Cis-Element Decoy eine doppelsträngige Nukleinsäure ist, umfasst das erfindungsgemäße Decoy-Oligonukleotid jeweils nicht nur die Sense- oder Forward-Sequenz sondern auch die komplementäre Antisense- oder Reverse-Sequenz. Bevorzugte erfindungsgemäße Decoy-Oligonukleotide weisen eine 10-mer-Kernbindungssequenz für den inhibitorischen Transkriptionsfaktor auf, wie sie in SEQ ID NO:33 enthalten ist. Das Cis-Element Decoy kann jedoch auch eine zur vorstehenden Sequenz abweichende Sequenz aufweisen und länger als ein 10-mer sein. Besonders bevorzugt sind die Sequenzen wie sie in SEQ ID NO:1 bis SEQ ID NO:34 enthalten sind. Diese Aufzählung der bevorzugten Sequenzen ist nicht abschließend. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass eine Vielzahl von Sequenzen als Inhibitor für den Transkriptionsfaktor verwendet werden können, solange sie die vorstehend

aufgeführten Bedingungen der 10-mer Konsensus-Kernbindungssequenz und eine Affinität zu dem Transkriptionsfaktor aufweisen.

Die Affinität der Bindung einer Nukleinsäuresequenz an diesen Transkriptionsfaktor kann durch die Verwendung des Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191) bestimmt werden. Dieses Testsystem ist für die Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren, die für die Verwendung in der Methode der gegenwärtigen Erfindung gedacht sind, oder die Bestimmungen der optimalen Länge einer Bindungsstelle geeignet. Sie ist auch für die Identifizierung von anderen Sequenzen, die durch den Transkriptionsfaktor gebunden werden, geeignet.

Die Methode der vorliegenden Erfindung moduliert die Transkription eines Gens oder von Genen in einer solchen Weise, dass das Gen oder die Gene, z.B. *eNOS*, vermehrt exprimiert werden. Vermehrte Expression im Rahmen der gegenwärtigen Erfindung bedeutet, dass die Transkriptionsrate gesteigert ist im Vergleich zu Zellen, die nicht mit einem erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotid behandelt werden. Solch eine Steigerung kann beispielsweise durch Northern Blot (Sambrook et al., 1989) oder RT-PCR (Sambrook et al., 1989) bestimmt werden. Typischerweise ist eine solche Steigerung zumindest eine 2-fache, besonders zumindest eine 5-fache, insbesondere zumindest eine 10-fache Enthemmung der Genexpression.

Oligonukleotide werden in der Regel schnell durch Endo- und Exonukleasen, im besonderen DNasen und RNasen in der Zelle abgebaut. Deshalb können die Nukleinsäuren modifiziert werden, um sie gegen den Abbau zu stabilisieren, so dass über einen längeren Zeitraum eine hohe Konzentration der Oligonukleotide in der Zelle beibehalten wird. Typischerweise kann eine solche Stabilisierung durch die Einführung einer oder mehrerer modifizierter Internukleotidbindungen erhalten werden.

Ein erfolgreich stabilisiertes DNA-Oligonukleotid oder Decoy-Oligonukleotid enthält nicht notwendigerweise eine Modifikation an jeder Internukleotidbindung. Vorzugsweise sind die Internukleotidbindungen an den jeweiligen Enden beider Oligonukleotide des Cis-Element Decoys modifiziert. Dabei können die letzten sechs, fünf, vier, drei, zwei oder die letzte oder eine oder mehrere Internukleotidbindungen innerhalb der letzten sechs Internukleotidbindungen

modifiziert sein. Ferner können verschiedene Modifikationen der Internukleotidbindungen in die Nukleinsäure eingeführt werden und die daraus entstehenden Decoy-Oligonukleotide auf sequenzspezifische Bindung an den inhibitorischen Transkriptionsfaktor, unter Verwendung des Routine EMSA-Testsystems, getestet werden. Dieses Testsystem erlaubt die Bestimmung der Bindungskonstante des Cis-Element Decoys und so die Bestimmung, ob die Affinität durch die Modifikation verändert wurde. Modifizierte Cis-Element Decoys, die noch eine ausreichende Bindung zeigen, können ausgewählt werden, wobei eine ausreichende Bindung zumindest etwa 50% oder zumindest etwa 75%, und besonders bevorzugt etwa 100% der Bindung der unmodifizierten Nukleinsäure bedeutet.

Cis-Element Decoys mit modifizierter Internukleotidbindung, die immer noch ausreichende Bindung zeigen, können überprüft werden, ob sie stabiler in der Zelle sind als unmodifizierte Cis-Element Decoys. Die mit den erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys "transfizierten" Zellen werden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Menge der dann noch vorhandenen Cis-Element Decoys untersucht. Dabei wird vorzugsweise ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Texas-Rot) markiertes Cis-Element Decoy oder ein radioaktiv markiertes (z.B. ^{35}S) Cis-Element Decoy eingesetzt mit anschließender digitaler Fluoreszenzmikroskopie bzw. Autoradiographie oder Szintigraphie. Ein erfolgreich modifiziertes Cis-Element Decoy hat eine Halbwertszeit in der Zelle, die höher ist als die eines unmodifizierten Cis-Element Decoys, vorzugsweise von zumindest etwa 48 Stunden, mehr bevorzugt von zumindest etwa 4 Tagen, am meisten bevorzugt von mindestens etwa 7 Tagen.

Geeignete modifizierte Internukleotidbindungen sind in Uhlmann und Peyman ((1990) Chem. Rev. 90, 544) zusammengefasst. Modifizierte Internukleotid-Phosphat-Reste und/oder Nicht-Phosphor-Brücken in einer Nukleinsäure, die in einer Methode der gegenwärtigen Erfindung eingesetzt werden können, enthalten zum Beispiel Methylphosphonat, Phosphorothioat, Phosphorodithioat, Phosphoramidat, Phosphatester, während Nicht-Phosphor-Internukleotid-Analoga, beispielsweise Siloxan-Brücken, Carbonat-Brücken, Carboxymethylester-Brücken, Acetamidat-Brücken und/oder Thioether-Brücken enthalten. Bei der Verwendung Phosphorothioat-modifizierter Internukleotidbindungen sollten diese vorzugsweise nicht zwischen den Basen Cytosin und Guanin liegen, da dies zu einer Aktivierung der Zielzellen des Cis-Element Decoys im Sinne einer entzündlichen Reaktion führen kann.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist die Stabilisierung von Nukleinsäuren durch die Einführung struktureller Merkmale in die Nukleinsäure, welche die Halbwertszeit der Nukleinsäure erhöhen. Solche Strukturen, die Haarnadel- und Glocken-DNA enthalten, sind in US 5,683,985 offenbart. Gleichzeitig können modifizierte Internukleotid-Phosphat-Reste und/oder Nicht-Phosphor-Brücken, zusammen mit den genannten Strukturen, eingeführt werden. Die sich daraus ergebenden Nukleinsäuren können im oben beschriebenen Testsystem auf Bindung und Stabilität geprüft werden.

Ein Cis-Element Decoy der vorliegenden Erfindung wird schnell in die Zelle aufgenommen. Eine ausreichende Aufnahme ist durch die Modulation der Expression von einem oder mehreren Genen, die einer Kontrolle durch den Ziel-Transkriptionsfaktor unterliegen, charakterisiert (z.B. *eNOS*). Das Cis-Element Decoy der vorliegenden Erfindung moduliert in bevorzugter Weise die Transkription von einem Gen oder Genen nach etwa 4 Stunden der Berührung mit der Zelle, mehr bevorzugt nach etwa 2 Stunden, nach etwa 1 Stunde, nach etwa 30 Minuten und am meisten bevorzugt nach etwa 10 Minuten. Eine typische Mischung, die in so einem Versuch eingesetzt wird, enthält 10 µmol/l Cis-Element Decoy.

Um die Wirksamkeit der therapeutischen Decoy-Oligonukleotide sicher zu stellen, ist es wünschenswert die Patienten vor Verabreichung der Decoy-Oligonukleotide auf die $^{-786}\text{C}/\text{T}$ -Varianz, d.h. auf die heterozygote oder homozygote Trägerschaft der ^{-786}C -Variante des *eNOS*-Gens, zu untersuchen bzw. zu diagnostizieren, wobei das erfindungsgemäße Diagnoseverfahren verwendet wird, das vorzugsweise eine Echtzeit-PCR und nachfolgende Schmelzkurven-Analyse oder eine Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) umfaßt.

Ferner ist es wünschenswert die erfindungsgemäßen Diagnoseverfahren bei Patienten zu verwenden, die sich einem operativen Eingriff unterziehen müssen, bei dem beispielsweise die Blutversorgung eines oder mehrerer Organe kurzfristig unterbrochen wird oder eines oder mehrere autologe Gefäßtransplantate übertragen werden (z.B. aortokoronare Venenbypasschirurgie), um während und im Anschluss an den operativen Eingriff eine Behandlung mit den erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotiden und/oder mit Arzneimitteln durchzuführen, welche die NO-Synthesekapazität des Gefäßendothels steigern bzw. die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid im Organismus erhöhen wie z.B. Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Inhibitoren, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, Antioxidantien oder

Stickstoffmonoxid-freisetzende Vasodilatoren. Ferner soll die Genotypisierung mit den erfindungsgemäßen Diagnoseverfahren auch bei Spendern von Organen durchgeführt werden, um das Transplantat zwischen Explantation und Implantation (d.h. *ex vivo*) und/oder den Organempfänger für einen Zeitraum von mindestens 3 Tagen, mehr bevorzugt von zumindest etwa 2 Wochen, am meisten bevorzugt von mindestens etwa 6 Monaten mit den erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotiden und/oder den oben genannten Arzneimitteln zu behandeln.

10 Ferner können die erfindungsgemäßen Diagnoseverfahren dazu verwendet werden, das individuelle Risiko einer Person abzuschätzen, an einer der mit der $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz des *eNOS*-Gens assoziierten Krankheiten zu erkranken und die Träger des $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyps im Sinne einer Präventionsstrategie, insbesondere im Hinblick auf die Vermeidung weiterer Riskofaktoren, zu beraten.

15 Ferner können die erfindungsgemäßen Diagnoseverfahren dazu verwendet werden, Träger des $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyps – alternativ oder zusätzlich zu der Behandlung mit den erfindungsgemäßen Decoy-Oligonukleotiden – einer Therapie mit Arzneimitteln zuzuführen, welche die NO-Synthesekapazität des Gefäßendothels steigern bzw. die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid im Organismus erhöhen, wie z.B. Angiotensin-Konversionsenzym (ACE)-Inhibitoren, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, Antioxidantien oder Stickstoffmonoxid-freisetzende Vasodilatoren.

25 Die vorliegende Erfindung betrifft somit Verfahren zur Diagnose einer $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz im humanen *eNOS*-Gen, umfassend die Schritte: Zugabe von DNA-Oligonukleotiden zu einer Patienten-DNA-Probe, wobei ein DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromaufwärts der $^{-786}$ -Position des *eNOS*-Gens liegt und dem Sense-Strang entspricht und ein weiteres DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromabwärts der $^{-786}$ -Position des *eNOS*-Gens liegt und dem Antisense-Strang entspricht, Durchführen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Durchführen einer DNA-Spaltung mit einem Restriktionsenzym, das eine Erkennungssequenz aufweist, die mindestens 4 Nukleotide lang ist und die Sequenz 5'-CCGG-3' aber nicht die Sequenz 5'-CTGG-3' enthält, und Nachweisen der durch die DNA-Spaltung erhaltenen DNA-Fragmente. Die DNA-Oligonukleotide dienen als Primer für die PCR.

Mit der *eNOS*-Sequenz ist die unter der GenBank Accession Number L10693 (gi:348219) aufgeführte Sequenz gemeint, die hier auch als Sense-Strang bezeichnet wird und dem Strang entspricht, der die mRNA-Sequenz des *eNOS*-Genproduktes enthält. Der Start wird mit +1 bezeichnet, entsprechend liegt die Position -786 vor dem Startpunkt stromaufwärts. Als Antisense-Strang wird der zum Sense-Strang komplementäre Strang bezeichnet, der auch als Matrize bezeichnet wird.

Die DNA-Oligonukleotide (Primer) können jede Länge aufweisen, die für eine PCR erforderlich ist. Die DNA-Oligonukleotide können ferner solche Sequenzen aus dem *eNOS*-Gens oder dem 5'-Bereich des *eNOS*-Gens aufweisen, die die Durchführung einer PCR erlauben. Dazu müssen die Primer weit genug auseinander liegen, so dass ein Nachweis der Amplifikate und der gespaltenen Amplifikate möglich ist, aber nicht soweit, dass kein Amplifikat mehr erzeugt wird. Ferner sollten die Primer so ausgewählt werden, dass bei einer DNA-Spaltung DNA-Fragmente mit einer derart unterschiedlichen Größe entstehen, die einfach nachzuweisen sind. Vorzugsweise haben die Primer die Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 35 und 36. Vorzugsweise ist das Restriktionsenzym *HpaII* und das Nachweisverfahren eine Agarose-Gelelektrophorese oder eine Kapillarelektrophorese.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend die vorstehenden DNA-Oligonukleotide (Primer), Reagenzien zur Durchführung einer PCR vorzugsweise einschließlich der Taq-Polymerase, ein Restriktionsenzym und Reagenzien zur Durchführung einer DNA-Spaltung.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur schnellen Bestimmung des $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz des humanen *eNOS*-Gens, umfassend folgende Schritte: Zugabe von DNA-Oligonukleotiden zu einer Patienten-DNA-Probe, wobei ein DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromaufwärts der -786-Position des *eNOS*-Gens liegt und dem Sense-Strang entspricht (Primer 1), ein weiteres Fluoreszenzfarbstoff-modifiziertes DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die die -786-Position des *eNOS*-Gens umfasst und dem Sense- oder Antisense-Strang entspricht und zur ^{-786}C -Variante des *eNOS*-Genpromotors komplementär ist (Detektionsprobe), ein weiteres Fluoreszenzfarbstoff-modifiziertes DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die dem Sense- oder Antisense-Strang entspricht (Ankerprobe) und wobei das 3'-Ende der Ankerprobe 1-5 Nukleotide stromaufwärts vom 5'-Ende der Detektionsprobe liegt,

- wenn die Anker- und Detektionsprobe jeweils dem Sense-Strang entspricht, und wobei das 5'-Ende der Ankerprobe 1-5 Nukleotide stromaufwärts vom 3'-Ende der Detektionsprobe liegt, wenn die Anker- und Detektionsprobe jeweils dem Antisense-Strang entspricht, und ein weiteres DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromabwärts der -786-Position des *eNOS*-Gens liegt und dem Antisense-Strang entspricht (Primer 2), Durchführen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Nachweis der ^{786}C - und/oder ^{786}T -Variante mittels einer Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-(FRET)-gestützten DNA-Schmelzkurven-Analyse (Figur 7).
- 10 Die Primer 1 und 2 können jede Länge aufweisen, die für eine PCR erforderlich ist. Die Primer können ferner solche Sequenzen aus dem *eNOS*-Gen oder dem 5'-Bereich des *eNOS*-Gens aufweisen, die die Durchführung einer PCR erlauben. Dazu müssen die Primer weit genug auseinander liegen, so dass ein Nachweis der Amplifikate und gegebenenfalls der gespaltenen Amplifikate möglich ist, aber nicht soweit, dass kein Amplifikat mehr erzeugt wird.
- 15 Vorzugsweise besitzt Primer 1 die Sequenz 5'-CTGGGAACTGTAGTTTCCCTAG-3' gemäß SEQ ID NO: 56 und Primer 2 die Sequenz 5'-ACCCTGTCATTTCAGTGACGCAC-3' gemäß SEQ ID NO: 57.
- Vorzugsweise sind sowohl die im Verfahren verwendete Anker- als auch die Detektionsprobe
- 20 zum Sense-Strang komplementär und weisen die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 37 (5'-GGGTCAGCCGGCCAGGGAA-3') für die Detektionsprobe und die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 (5'-AGCTTGATGCCCTGGTGGGAG-3') für die Ankerprobe auf. Die Detektionsprobe ist am 3'-Ende kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (z.B. Fluorescein, Anregungswellenlänge 494 nm). Die Ankerprobe ist am 5'-Ende kovalent mit einem
- 25 Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der sich von dem der Detektionsprobe unterscheidet (z.B. LC Red-640, Emissionswellenlänge 640 nm). Ferner ist die Ankerprobe an 3'-Position der letzten Desoxyribose phosphoryliert, vorzugsweise mit PO_4^{3-} . Die Ankerprobe weist eine Schmelztemperatur von 5-10°C über dem Schmelzpunkt der Detektionsprobe auf. Die Farbstoffkombination ist so gewählt, dass der exzitierter Farbstoff der Detektionsprobe geeignet
- 30 ist, den Farbstoff der Ankerprobe effizient so durch FRET anzuregen, dass er Licht einer definierten Wellenlänge emittiert solange beide Proben in unmittelbarer Nähe zueinander sind. Sowohl die Detektionsprobe als auch die Ankerprobe sind nicht für die PCR geeignet, da beide durch ihre chemischen Modifikationen in der 3'- bzw. 5'-Position keine enzymatische

Kettenverlängerung erlauben.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind sowohl die im Verfahren verwendete Anker- als auch die Detektionsprobe zum Antisense-Strang komplementär und weisen die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 59 (5'-TTCCCTGGCCGGCTGA-3') für die Detektionsprobe und die Sequenz gemäß SEQ ID NO: 58 (5'-GCTCCCACCAGGGCATCAAGCT-3') für die Ankerprobe auf. Die Detektionsprobe ist am 5'-Ende kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. LC Red-640) gekoppelt. Die Ankerprobe (SEQ ID NO: 58) ist am 3'-Ende kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der sich von dem der Detektionsprobe unterscheidet (z.B. Fluorescein). Ferner ist die Detektionsprobe an 3'-Position der letzten Desoxyribose phosphoryliert, vorzugsweise mit PO_4^{3-} . Die Ankerprobe weist eine Schmelztemperatur von 5-10°C über dem Schmelzpunkt der Detektionsprobe auf. Die Farbstoffkombination ist so gewählt, dass der exzitierter Farbstoff der Ankerprobe geeignet ist, den Farbstoff der Detektionsprobe effizient so durch FRET anzuregen, dass er Licht einer definierten Wellenlänge emittiert solange beide Proben in unmittelbarer Nähe zueinander sind.

Vorzugsweise hat die Ankerprobe demnach eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 38 oder 58 und die Detektionsprobe eine Sequenz gemäß SEQ ID NO: 37 oder 59. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass DNA-Oligonukleotide beispielsweise mit anderen Sequenzen als Detektions- bzw. Ankerproben verwendet werden können als die hier spezifisch aufgeführten. Ferner müssen die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Detektions- und Ankerproben nicht notwendigerweise den gleichen Strang binden sondern beispielsweise die Detektionsprobe kann den Sense-Strang und die Ankerprobe den Antisense-Strang binden oder umgekehrt. Es ist in einem solchen Fall nicht notwendig, dass die Sequenzen der Proben so gewählt werden, dass die Proben in unmittelbarer Nachbarschaft positioniert sind.

Für die Bestimmung der $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz des humanen *eNOS*-Gens einer Patientenprobe werden in einen PCR-Ansatz neben den für die PCR notwendigen Reagenzien und die zu untersuchende Patienten-DNA außerdem die vorstehend beschriebenen Primer 1 und 2 und die Detektions- und Ankerprobe gegeben. Nach der durch die Primer 1 und 2 vermittelten PCR-Amplifikation eines Fragmentes des *eNOS*-Promoters, welches die Position -786 des Gens enthält, wird die Temperatur des Ansatzes so erhöht, dass alle DNA-Doppelstränge denaturieren. Hierauf wird die Temperatur wieder erniedrigt, so dass Detektions- und Ankerproben mit den Sense- bzw.

Antisense-Strängen des amplifizierten Fragmentes hybridisieren, abhängig davon ob die Probenkombination zu dem Sense- oder Antisense-Strang komplementär ist (siehe Fig. 8).

5 Nun wird beispielsweise bei den Proben gemäß SEQ ID NO:37 und 38, die komplementär zum Sense-Strang sind, die Schmelzkurve durch Anregung des Farbstoffes der Detektionsprobe und kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz der Ankerprobe bei gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur (z.B. etwa 0,1°C pro Sekunde) aufgenommen. Hierbei wird ausgenutzt, dass die Übertragung der Anregungsenergie des Farbstoffes der Detektionsprobe auf den der Ankerprobe nur so lange funktioniert, wie beide Proben an den Sense-Strang gebunden haben. Eine
10 Unterscheidung der ⁻⁷⁸⁶T- von der ⁻⁷⁸⁶C-Variante erfolgt über die Temperatur, bei der die Detektionsprobe vom Sense-Strang abschmilzt, also die FRET-induzierte Fluoreszenz deutlich abnimmt. Dies ist für die Detektionsprobe bei Fragmenten der ⁻⁷⁸⁶T-Variante aufgrund des auftretenden G-T-Mismatches circa 12°C früher der Fall als bei Sense-Strängen der ⁻⁷⁸⁶C-Variante.

15 Ferner wird nun beispielsweise bei den Proben gemäß SEQ ID NO:58 und 59, die komplementär zum Antisense-Strang sind, die Schmelzkurve durch Anregung des Farbstoffes der Ankerprobe und kontinuierlicher Messung der Fluoreszenz der Detektionsprobe bei gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur (z.B. etwa 0,1°C pro Sekunde) aufgenommen. Hierbei wird ausgenutzt, dass die
20 Übertragung der Anregungsenergie des Farbstoffes der Ankerprobe auf den der Detektionsprobe nur so lange funktioniert, wie beide Proben an den Antisense-Strang gebunden haben. Eine Unterscheidung der ⁻⁷⁸⁶T- von der ⁻⁷⁸⁶C-Variante erfolgt über die Temperatur, bei der die Detektionsprobe vom Antisense-Strang abschmilzt, also die FRET-induzierte Fluoreszenz deutlich abnimmt. Dies ist für die Detektionsprobe bei Fragmenten der ⁻⁷⁸⁶T-Variante aufgrund
25 des auftretenden C-A-Mismatches circa 12°C früher der Fall als bei Antisense-Strängen der ⁻⁷⁸⁶C-Variante.

Für den Nachweis wird vorzugsweise ein Fluoreszenz-basierendes Echtzeit-PCR-Gerät (z.B. der LightCycler der Firma Roche) verwendet. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass nicht nur die
30 Bestimmung eines Genotyps in einer PCR, sondern auch gleichzeitig die Bestimmung von mehr als einem Genotyp in einer PCR, in einer sogenannten Multiplex-PCR, durchgeführt werden kann.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner DNA-Oligonukleotide mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 35 bis 38 und 56 bis 59.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend die vorstehenden Primer 1 und 2, zwei weitere DNA-Oligonukleotide (Detektionsprobe und Ankerprobe), Reagenzien zur Durchführung einer PCR vorzugsweise einschließlich der Taq-Polymerase, und Reagenzien zur Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Modulation der Transkription von mindestens einem Gen in Zellen, insbesondere in eNOS-exprimierenden Zellen wie Endothelzellen, Epithelzellen der Lungen, Nieren und des weiblichen Urogenitaltraktes, Herzmuskelzellen, Thrombozyten und neuronale Zellen (Hippocampus), wobei die Methode den Schritt der Kontaktierung der genannten Zellen mit einer Mischung, enthaltend eine oder mehrere erfindungsgemäße Decoy-Oligonukleotide, die in der Lage sind, sequenzspezifisch an den inhibitorischen Transkriptionsfaktor zu binden, umfasst. Ein bevorzugtes Verfahren ist z.B. die intraartikuläre Injektion der Nukleinsäurehaltigen Mischung in ein oder mehrere Gelenke bei Patienten mit rheumatoider Arthritis.

Die Mischung enthaltend die erfindungsgemäßen Cis-Element Decoys wird mit den Zielzellen (z.B. Endothelzellen) in Berührung gebracht. Das Ziel dieses In-Berührung-Bringens ist die Übertragung der Cis-Element Decoys, die den inhibitorischen Transkriptionsfaktor binden, in die Zielzelle (d.h. zum Beispiel die eNOS-exprimierende Endothelzelle). Deshalb können Nukleinsäure-Modifikation und/oder Zusatzstoffe oder Hilfsstoffe, von denen bekannt ist, dass sie die Durchdringung von Membranen erhöhen, im Rahmen der gegenwärtigen Erfindung benutzt werden (Uhlmann und Peyman (1990) Chem. Rev. 90, 544).

Eine mit den Zielzellen in Berührung gebrachte Mischung gemäß der Erfindung enthält in einer bevorzugten Ausführungsform im Wesentlichen nur Nukleinsäure und Puffer. Der für Decoy-Oligonukleotide geeignete Konzentrationsbereich liegt bei 0,1 bis 100 $\mu\text{mol/l}$, vorzugsweise bei 0,5 bis 25 $\mu\text{mol/l}$ und besonders bevorzugt bei 10 $\mu\text{mol/l}$. Es können ein oder mehrere geeignete Puffer zugesetzt werden. Ein Beispiel eines solchen Puffers ist eine modifizierte Ringer-Lösung enthaltend 145 mmol/l Na^+ , 5 mmol/l K^+ , 11 mmol/l Cl^- , 2 mmol/l Ca^{2+} , 1 mmol/l Mg^{2+} , 10

mmol/l Hepes, 145 mmol/l Isethionat, 10 mmol/l D-Glucose, pH 6,5.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthält die Mischung zusätzlich mindestens einen Zusatzstoff und/oder Hilfsstoff. Zusatzstoffe und/oder Hilfsstoffe wie Lipide, kationische Lipide, Polymere, Liposomen, Nanopartikel, Nukleinsäure-Aptamere, Peptide und Proteine, die an DNA gebunden sind, oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind beabsichtigt, um beispielsweise die Einbringung von Nukleinsäuren in die Zelle zu erhöhen, um die Mischung auf nur eine Untergruppe von Zellen zu richten, um den Abbau der Nukleinsäure in der Zelle zu verhindern, und um die Lagerung der Nukleinsäuremischung vor der Verwendung zu erleichtern. Beispiele für Peptide und Proteine oder synthetische Peptid-DNA-Moleküle sind z.B. Antikörper, Antikörperfragmente, Liganden, Adhäsionsmoleküle, die alle modifiziert oder unmodifiziert sein können.

Zusatzstoffe, die die Cis-Element Decoys in der Zelle stabilisieren, sind beispielsweise Nukleinsäure-kondensierende Substanzen wie kationische Polymere, Poly-L-Lysin oder Polyethylenimin.

Die Mischung, die in dem Verfahren der gegenwärtigen Erfindung eingesetzt wird, wird bevorzugt lokal angewendet durch Injektion, Infusion, Katheter, pluronische Gele, Polymere, die anhaltend Medikamente freisetzen, oder jede andere Vorrichtung, die lokalen Zugang ermöglicht. Auch die *ex vivo* Anwendung der Mischung (Infusion bzw. Inkubation), verwendet im Verfahren der gegenwärtigen Erfindung, erlaubt einen lokalen Zugang.

Die folgenden Beispiele dienen nur der Erläuterung und beschränken in keiner Weise den Umfang der Erfindung.

1. Patienten

Für die Analyse der Häufigkeitsverteilung der $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz des *eNOS*-Gens bei koronarer Herzkrankheit (KHK), rheumatoider Arthritis, multipler Sklerose oder Morbus Crohn wurde aus Blut von Patienten (circa 2 ml) genomische DNA isoliert und diese mittels PCR-Amplifikation und nachfolgender RFLP-Analyse (s. u.) auf die Varianz hin untersucht.

Bei der Analyse von Patienten mit rheumatoider Arthritis konnte auf zwei bereits vorhandene Kollektive zurückgegriffen werden. Hierbei konnten anonymisierte (Zahlencode) DNA-Proben von Patientinnen und Patienten der Rheuma-Ambulanz der Universität Göttingen und der Abteilung Rheumatologie des Universitätsklinikums Freiburg auf die Varianz getestet werden.

- 5 Beide Kollektive bieten eine typische Verteilung von Patientinnen und Patienten mit rheumatoider Arthritis, d.h. die betroffenen Personen sind zu etwa 80% weiblich. Das Altersprofil reichte von 20 Jahren bis zu 80 Jahren mit Häufungen (*peaks*) der Patientenzahlen bei 35-40 Jahren (*early onset*) und 60-70 Jahren (*late onset*).

- 10 Für die Analyse der $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz des *eNOS*-Gens bei koronarer Herzkrankheit wurden Blutproben während der Durchführung einer Herzkatheteruntersuchung entnommen. Auf diese Weise konnte das Vorliegen der Erkrankung eindeutig festgestellt bzw. ausgeschlossen werden. Alle Patienten wurden vor der Blutabnahme mündlich und schriftlich aufgeklärt und hatten der Verwendung ihrer Blutproben schriftlich zugestimmt. Die Genotypisierung erfolgte in anonymisierter Form (Zahlenkodierung), Alter, Diagnose, Geschlecht und Risikofaktorprofil der
- 15 zugehörigen Personen wurden nach erfolgter Analyse mitgeteilt. Für die statistische Analyse der Genotypverteilung wurden Individuen bis 64 Jahre herangezogen. Die Verteilung der bereits bekannten primären Risikofaktoren für KHK (Hypertonie, Diabetes mellitus, Zigarettenrauchen und Hypercholesterinämie) war unabhängig vom Genotyp der jeweiligen Patienten.

20 Tabelle 1

$^{-786}\text{C/T}$ -Polymorphismus des *eNOS*-Gens bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. OR, *odds ratio* im Vergleich zum Kontrollkollektiv. Kontrollpersonen, DNA aus Nabelschnüren.

	C/C	C/T	T/T	Gesamt
Patienten mit koronarer Herzkrankheit OR 1,81	33 (19,0%)	89 (51,1%)	52 (29,9%)	174
Patienten ohne koronare Herzkrankheit OR 0,35	7 (4,4%)	69 (43,7%)	82 (51,9%)	158
Kontrollpersonen	78 (11,8%)	319 (48,2%)	265 (40,0%)	662

Als Vergleichskollektiv zur Genotypverteilung wurde DNA aus der Nabelschnurarterie von Neugeborenen aus Göttingen und Umgebung (im Umkreis von circa 70 km) verwendet. Auch diese Proben waren anonymisiert und die Eltern der Kinder hatten zuvor eine schriftliche Einverständniserklärung für die entsprechende Verwendung der Nabelschnur abgegeben. Für die

5 Genotypisierung der Patienten mit multipler Sklerose bzw. Morbus Crohn standen anonymisierte genomische DNA-Proben zur Verfügung (Universitätsklinikum Charité Berlin, Institut für Neuroimmunologie und Universität Göttingen, Abteilung Immunologie).

Tabelle 2

10 ⁻⁷⁸⁶C/T-Polymorphismus des *eNOS*-Gens bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn. OR, *odds ratio*. Kontrollpersonen, DNA aus Nabelschnüren.

	C/C	C/T	T/T	Gesamt
Patienten mit rheumatoider Arthritis OR 1,55	99 (17,0%)	262 (44,9%)	223 (38,1%)	584
Patienten mit Morbus Crohn OR 1,47	18 (16,4%)	52 (47,3%)	40 (36,4%)	110
Kontrollpersonen	78 (11,8%)	319 (48,2%)	265 (40,0%)	662

15 2. Genotypisierung

Die ⁻⁷⁸⁶C-Variante des humanen *eNOS*-Genpromotors besitzt im Vergleich zur ⁻⁷⁸⁶T-Variante eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle für das Restriktionsenzym *Hpa* II und ist somit einer klassischen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP-Analyse) zugänglich. Alternativ ist die oben genannte Varianz auch einer Echtzeit-PCR gefolgt von einer FRET-

20 Analyse zugänglich.

RFLP-Analyse

Für die RFLP-Analyse wurden aus genomischer DNA (aus Blut mit Hilfe des QIAamp DNA Mini-Kits von Qiagen, Hilden gewonnen) mit Hilfe *eNOS*-Promotor-spezifischer Primer (Vorwärtsprimer 5'-GAGTCTGGCCAACACAAATCC-3' (SEQ ID NO: 35); umgekehrter Primer

25 5'-GACCTCTAGGGTCATGCAGGT-3') (SEQ ID NO: 36) durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ein DNA-Fragment (657 Basenpaaren (bp); von Position -1135 bis -456 des humanen

eNOS-Gens) amplifiziert und anschließend einer spezifischen Hydrolyse durch die Restriktionsendonuklease *Hpa* II unterworfen. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Je nach Genotyp entstehen aus dem 657 bp-Fragment 2 oder 3 kleinere DNA-Fragmente. Während die T-Variante des Promoters im betrachteten Abschnitt nur eine *Hpa* II-Schnittstelle besitzt und so nach Hydrolyse durch *Hpa* II in zwei Fragmente (284 bp und 373 bp) zerfällt, bewirkt die zusätzliche Schnittstelle der C-Variante, dass 3 Fragmente entstehen (46 bp – im verwendeten Elektrophoresesystem nicht detektierbar – 284 bp und 327 bp). Insofern ließen sich die drei möglichen Genotypen ($^{-786}\text{C/C}$, $^{-786}\text{T/T}$ und $^{-786}\text{C/T}$) nach Elektrophorese durch folgende Fragmentmuster eindeutig identifizieren: $^{-786}\text{T/T}$: 284 und 373 bp; $^{-786}\text{C/C}$: 284 und 327 bp; und $^{-786}\text{C/T}$: 284, 327 und 373 bp.

FRET-Analyse

Für die FRET-Analyse wurden aus genomischer DNA (aus Blut mit Hilfe des QIAamp DNA Mini-Kits von Qiagen, Hilden gewonnen) mit Hilfe *eNOS*-Promotor-spezifischer Primer (Vorwärtsprimer 5'-CTGGGAAGTGTAGTTTCCTAG-3' (SEQ ID NO: 56); umgekehrter Primer 5'-ACCCTGTCATTGAGTGACGCAC-3' (SEQ ID NO: 57) durch PCR in einem Echtzeit-PCR-Gerät (LightCycler der Firma Roche) ein DNA-Fragment (137 bp); von Position – 848 bis –711 des humanen *eNOS*-Gens, GenBank Accession No. L10693) amplifiziert. Nach der PCR-Amplifikation wurde mit Hilfe der vor der PCR zugegebenen Ankerprobe (SEQ ID NO: 58) und Detektionsprobe (SEQ ID NO: 59) eine Schmelzkurve aufgenommen, die den Fluoreszenzresonanzenergie-Transfer vom Fluoreszenzfarbstoff der Ankerprobe (Fluorescein) auf den der Detektionsprobe (LC-Red 640) aufnahm. T-Allele konnten aufgrund ihres Schmelzpunktes (circa 48°C) eindeutig von C-Allelen (Schmelzpunkt circa 60°C) unterschieden werden.

3. Zellkultur

Humane Endothelzellen wurden durch Behandlung mit 1,6 U/ml Dispase in Hepes-modifizierter Tyrodelösung für 30 Min. bei 37°C aus Nabelschnurvenen von zuvor genotypisierten Spendern isoliert und auf Gelatine-beschichteten 6-Loch-Gewebekulturschalen (2 mg/ml Gelatine in 0,1 M HCl für 30 Min. bei Umgebungstemperatur) in 1,5 ml M199 Medium (Gibco Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland), enthaltend 20% fötales Kälberserum, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 10 U/ml Nystatin, 5 mmol/l HEPES und 5 mmol/l TES, 1 µg/ml Heparin und 40 µg/ml endothelialer Wachstumsfaktor, kultiviert. Sie wurden durch ihre typische

Pflasterstein-Morphologie, positive Immunfärbung für von Willebrandt-Faktor (vWF) und fluorimetrischen Nachweis (FACS) von PECAM-1 (CD31) sowie negative Immunfärbung für glattmuskuläres α -Actin (Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191) identifiziert.

- 5 Die Maus-Myelomzelllinie P3xTBA7 (stabil mit humanem CD40-Liganden transfiziert) und P3x63Ag8.653 (nicht transfizierte Kontrollzellen) wurden in RPMI 1640 Medium (Life Technologies), enthaltend 10% fötales Kälberserum, 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin und 10 U/ml Nystatin kultiviert. Die Applikation von Wandschubspannung (in der Regel 30 dyn/cm² für 24 bis 36 Stunden) bei den kultivierten Endothelzellen wurde mit Hilfe eines im
- 10 Brutschrank platzierbaren Kegel-Platte-Viskosimeters wie in Schubert et al. (2000) Circ. Res. 87, 1188 beschrieben durchgeführt, mit Ausnahme der Dimension der Kulturschalen (3,5 cm im Gegensatz zu 10,0 cm Durchmesser).

4. RT-PCR-Analyse

15 *Konventionelle RT-PCR*

- Die zelluläre Gesamt-RNA wurde mit dem Qiagen RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert, daran anschließend wurde eine cDNA-Synthese mit 1-5 μ g RNA und 200 U Superscript™ II Reverser Transkriptase (Life Technologies) in einem Gesamtvolumen von 20 μ l entsprechend der Herstelleranleitung durchgeführt. Für den Abgleich der cDNA-Mengen in den
- 20 verschiedenen Proben wurden 5 μ l der 1:10 verdünnten cDNA-Lösung (entsprechend einem RNA-Äquivalent von 25-125 ng) einer PCR-Reaktion (1 U Taq DNA-Polymerase ([Life Technologies]) mit spezifischen Primern für die konstitutiv exprimierten Genprodukte Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und ribosomales Protein L32 (rpl32) unterworfen. GAPDH und rpl32 dienten hierbei als interne Kalibrierungs-Standards. Die PCR-
- 25 Produkte wurden auf 1,5% Agarose-Gelen enthaltend 0,1% Ethidiumbromid separiert und die Intensität der Banden wurde densitometrisch mit einem CCD-Kamerasystem und der One-Dscan Gelanalyse-Software von Scanalytics (Billerica, MA, USA) bestimmt, um in nachfolgenden PCR-Analysen das Volumen der cDNA anzupassen.

- 30 Alle PCR-Reaktionen wurden einzeln für jedes Primerpaar in einem lizenzierten Thermocycler (PC-Personal Cycler, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die individuellen PCR-Bedingungen waren wie folgt:

eNOS – Produktgröße 581 bp, 30 Zyklen, Anlagerungstemperatur 58°C, Vorwärtsprimer 5'-

GGAACCTGTGTGACCCTC-3' (SEQ ID NO: 39), umgekehrter Primer 5'-CCACGTCATACT-CATCCA-3' (SEQ ID NO: 40)

IL-12p40 – 281 bp, 30 Zyklen, 62°C, 5'-GTACTCCACATTCCTACTTCT-3' (SEQ ID NO: 41), 5'-TTTGGGTCTATTCCGTTGTGTC-3' (SEQ ID NO: 42)

5 IL-10 Rezeptor – 565 bp, 32 Zyklen, 59°C, 5'-GGACACCCATCCCAAATCAGTC-3' (SEQ ID NO: 43), 5'-CACGGTGAAATACTGCCTGGTG-3' (SEQ ID NO: 44)

GAPDH – 571 bp, 19 Zyklen, 58°C, 5'-TCACCATCTTCCAGGAGCG-3' (SEQ ID NO: 45), 5'-CTGCTTCACCACCTTCTTGA-3' (SEQ ID NO: 46)

10 rpl32 – 368 bp, 20 Zyklen, 60°C, 5'-GTTTCATCCGGCACCAGTCAG-3' (SEQ ID NO: 47), 5'-ACGTGCACATGAGCTGCCTAC-3' (SEQ ID NO: 48)

Alle Amplifikate wurden durch DNA-Sequenzierung (ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) mit nachfolgendem Abgleich mit den entsprechenden Gensequenzen (Referenz: GenBank, NCBI, Bethesda, USA) eindeutig identifiziert.

15

Echtzeit-PCR

Der Echtzeit-PCR-Nachweis der eNOS mRNA-Expression wurde im Wesentlichen wie von Wagner et al. (2003), J. Immunol. 170, 1462 beschrieben durchgeführt. Fünf µl cDNA (M-MLV Reverse Transcriptase; Promega, Mannheim, Deutschland) entsprechend 10 ng Gesamt-RNA
20 wurde für jede PCR-Reaktion verwendet, die mithilfe des QuantiTect SYBR Green PCR-Kits der Fa. Qiagen (Hilden, Deutschland) und einem LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt wurde. Die eNOS-spezifischen mRNA-Fragmente (GenBank Accession No. NM 000603, 129 bp, Position 1151 bis 1279) wurden mithilfe des Vorwärtsprimers 5'-GGATGTGGCTGTCTGCATGGAC-3' (SEQ ID NO: 60) und des
25 umgekehrten Primers 5'-TGGTCCACGATGGTGACTTTGG-3' (SEQ ID NO: 61) amplifiziert. Zur Normalisierung wurde parallel die cDNA für GAPDH (GenBank Accession No. BT006893, 138 bp, Position 525 bis 662) amplifiziert (Vorwärtsprimer 5'-GACCACAGTCCATGCCATCACTGC-3' (SEQ ID NO: 62); umgekehrter Primer 5'-ATGACCTTGCCACAGCCTTGG-3' (SEQ ID NO: 63)). Das Programm zur Amplifizierung
30 beider Genprodukte bestand aus einer 15minütigen Inkubation bei 95°C gefolgt von 40 Zyklen mit 5 s bei 95°C, 25 s bei 58°C und 10 s bei 72°C. Die Schmelzkurve wurde mit einer Steigung von 0,2°C/s von 65 bis 95°C programmiert und die Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus gemessen. Für die quantitative Analyse wurde eine Standardkurve für beide Genprodukte mit

seriellen Verdünnungen der entsprechenden PCR-Fragmente (10^2 bis 5×10^8 Kopien/Reaktion) mit gemessen. Dazu wurden die Genprodukte in das Plasmid pCR-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) kloniert.

5. Decoy-Oligonukleotid-Technik

Doppelsträngige Decoy-Oligonukleotide wurden von den komplementären einzelsträngigen Phosphorothioat-verbundenen Oligonukleotiden (Eurogentec, Köln, Deutschland) wie bei Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben hergestellt. Die kultivierten humanen Endothelzellen wurden für 4 Stunden mit dem jeweiligen Decoy-Oligonukleotid in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ vorbehandelt und nach dem Mediumwechsel dem Inkubationsmedium in derselben Konzentration zugesetzt. Die einzelsträngigen Sequenzen der Oligonukleotide waren wie folgt (unterstrichene Buchstaben kennzeichnen Phosphorothioat-verbundene Basen):

STAT-3 5'-CCTGCATTCTGGGAACTGTAG-3' (SEQ ID NO: 49),
 15 STAT-3 mutated 5'-CCTGTATGCCGTGAGCTATAG-3', (SEQ ID NO: 50)

sowie die in Tabelle 3 abgebildeten Decoy-Oligonukleotide zur Neutralisierung des an die Position -786 des *eNOS*-Gens bindenden Transkriptionsfaktors. Die Sequenz des STAT-3 Decoy-Oligonukleotids entspricht der Position -858 bis -838 im humanen *eNOS*-Gen.

Tabelle 3

Restaurierung der inhibitorischen Wirkung von IL-10 auf die CD154-induzierte IL-12 p40 mRNA-Expression (ausgedrückt in % der IL-12 p40 mRNA-Expression in CD154-stimulierten Kontrollzellen; Mittelwert \pm S.E. von n individuellen Experimenten) in humanen kultivierten Endothelzellen von Spendern mit $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyp durch verschiedene Cis-Element Decoys (angegeben ist jeweils nur ein Strang der Decoy-Oligonukleotide sowie die entsprechende Position im Promoter des humanen *eNOS*-Gens). Bezugsgröße ist CD154-induzierte IL-12 p40 mRNA-Expression nach IL-10-Zusatz in Endothelzellen mit $^{-786}\text{T/T}$ -Genotyp ($55 \pm 2\%$ der Kontrolle, $n=6$; vollständige Restaurierung) bzw. $^{-786}\text{C/C}$ -Genotyp ($136 \pm 16\%$ der Kontrolle, $n=21$; kein Effekt).

SEQ ID NO	Position	Sequenz (5' \rightarrow 3')	IL-12 p40 (%)	n
--------------	----------	-------------------------------	------------------	-----

	1	-800/-779	AGCTCTTCCCTGGCCGGCTGAC	32 ± 8	7
	3	-800/-779/T	AGCTCTTCCCTGGCTGGCTGAC	60 ± 10	7
	5	-796/-774	CTTCCCTGGCCGGCTGACCCTGC	48 ± 7	5
	7	-796/-774/T	CTTCCCTGGCTGGCTGACCCTGC	67	2
5	9	-799/-781	GCTCTTCCCTGGCCGGCTG	65	2
	11	-802/-784	CAAGCTCTTCCCTGGCCGG	83	2
	13	-797/-779	TCTTCCCTGGCCGGCTGAC	41 ± 7	5
	15	-791/-773	CTGGCCGGCTGACCCTGCC	65	2
	17	-794/-779	TCCCTGGCCGGCTGAC	30	2
10	19	-791/-782	CTGGCCGGCT	13 ± 9	3
	21	-791/-782/T	CTGGCTGGCT	47 ± 20	3
	51	-788/-770	GCCGGCTGACCCTGCCTCA	105	1
	52	künstlich/T	TCTTCCCTAGCTGACTGAC	136 ± 25	5
	53	künstlich	TCCCTGACCGACTCAG	80 ± 21	3
15	54	künstlich/T	TCCCTAGCTGACTGAC	90	1

6. Elektrophoretische Mobilitätsshift-Analyse (EMSA)

Die nukleären Extrakte und [³²P]-markierten doppelsträngigen Konsensus-Oligonukleotide (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland), nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Autoradiographie und Supershift-Analyse wurden wie bei Krzesz et al. (1999) FEBS Lett. 453, 191 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Decoy-Oligonukleotide (einzelssträngige Sequenz, Kernbindungssequenz ist unterstrichen) verwendet:

25 STAT-3 5'-CCTGCATTCTGGGAACTGTAG-3' (SEQ ID NO: 49)
SIE 5'-GTGCATTTCCTCGTAAATCTTGTCTACA-3' (SEQ ID NO: 55)

An das Oligonukleotid SIE binden sowohl STAT-1 wie STAT-3. Insofern wurden zusätzlich Supershift-Analysen mit einem monoklonalen Maus-Anti-Human Supershift-Antikörper (Santa Cruz Biotechnologie) durchgeführt (Zugabe in einer Konzentration von 10 µg/ml zum Kernextrakt für 1 Stunde bei Raumtemperatur).

7. Western Blot-Analyse

Die humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen wurden durch fünfmaliges aufein-

anderfolgendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Protein-Extrakte wurden wie bei Hecker et al. (1994) Biochem J. 299, 247 beschrieben hergestellt. 20-30 µg Protein wurden mit Hilfe einer 10%igen Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen in der Gegenwart von SDS nach Standardprotokoll aufgetrennt und auf eine BioTrace™ Polyvinylidene Fluoride Transfermembran (Pall Corporation, Roßdorf, Deutschland) transferiert. Zum immulologischen Nachweis der eNOS und des IL-10 Rezeptors wurden monoklonale Maus-Anti-Human-Antikörper (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland; 1:5000 bzw. 1:3000 Verdünnung) verwendet. Die Proteinbanden wurden nach Hinzufügen eines Peroxidase-gekoppelten-Anti-Maus-IgG (1:3000, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit Hilfe der Chemilumineszenz-Methode (SuperSignal Chemiluminescent Substrate; Pierce Chemical, Rockford, IL, USA) und nachfolgender Autoradiographie (Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) nachgewiesen. Der Auftrag und Transfer gleicher Proteinmengen wurde nach „Strippen“ der Transfermembran (5 Minuten 0,2 N NaOH, nachfolgend 3 x 10 Minuten Waschen mit H₂O) durch Nachweis gleicher Proteinbanden von β-Aktin mit einem monoklonalen primären Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Anti-Maus IgG (beide von Sigma-Aldrich, 1:3000 Verdünnung) gezeigt.

8. IL-12 p40 ELISA

Der Enzym-gekoppelte Antikörper-Bindungs-Assay (ELISA) ist eine Standardmethode zur quantitativen Analyse von Proteinen. Er wurde wie in Lienenlücke et al. (2000) Eur. J. Immunol. 30, 2864 beschrieben zum Nachweis der IL-12 p40-Untereinheit im Überstand der inkubierten humanen Endothelzellen eingesetzt.

9. Statistische Analyse

Wenn nicht anders angezeigt, sind alle Daten in den Figuren als Mittelwert ± SEM von n Experimenten angegeben. Die statistische Auswertung wurde mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Dunnett Post-Test durchgeführt. Ein P-Wert <0.05 wurde als statistisch signifikanter Unterschied angesehen.

Patentansprüche

1. Decoy-Oligonukleotide mit der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 34.
- 5 2. Decoy-Oligonukleotide nach Anspruch 1 als Arzneimittel.
3. Decoy-Oligonukleotide nach Anspruch 1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Prävention oder Therapie von Atherosklerose, der koronaren Herzkrankheit, von Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, zerebralen Durchblutungsstörungen, Schlaganfall und
10 Multiinfarkt-Demenz, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, von chronischen Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen, der rheumatoiden Arthritis (chronische Polyarthrititis), der Schuppenflechte einschließlich Psoriasis-Arthritis, von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, von Diabetes Typ I und II, der diabetischen Nephropathie, Retinopathie und Vaskulopathie, von multipler
15 Sklerose, von Sarkoidosen, Kollagenosen und Vaskulitiden einschließlich Glomerulonephritiden, der akuten und chronischen Abstoßung transplanterter Organe, der *graft versus host disease* (GVHD) sowie dem Ischämie/Reperfusionsschaden von Organen im Anschluss an einen chirurgischen Eingriff, der Vaskulopathie von Venenbypässen, von (Prä-)Eklampsie und schwangerschaftsinduzierter Hypertonie, der arteriellen Hypertonie,
20 Linksherzhypertrophie, Aneurysmenbildung mit der Gefahr von Massenblutungen und dem Gefäßwandumbau, von pulmonaler Hypertonie, von chronischer Niereninsuffizienz, von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD), von bakteriellen Infektionen, *Helicobacter pylori*-Gastritis, tuberkulöse Perikarditis, Lyme-Borreliose mit nachfolgender Borrelien-Arthritis und Neuroborreliose, und von postinfektiösen Komplikationen nach
25 Infektion mit Cytomegalie-, Hepatitis B- und C-, Herpes- und HI (*human immunodeficiency*)-Viren wie z.B. portale Hypertonie, Fibrose und opportunistischen Infektionen wie z.B. der *Pneumocystis-carinii*-Pneumonie.
4. Verfahren zur Diagnose einer $^{-786}\text{C/T}$ -Varianz im *eNOS*-Gen, umfassend die folgenden
30 Schritte:
 - a) Zugabe von DNA-Oligonukleotiden zu einer Patienten-DNA- oder cDNA-Probe, wobei ein DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromaufwärts der -786-Position liegt und dem Sense-Strang des *eNOS*-Gens entspricht und ein weiteres DNA-

Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromabwärts der -786-Position liegt und dem Antisense-Strang des *eNOS*-Gens entspricht,

- b) Durchführen einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR),
- c) Durchführen einer DNA-Spaltung mit einem Restriktionsenzym, das eine Erkennungssequenz aufweist, die mindestens 4 Nukleotide lang ist und die Sequenz 5'-CCGG-3' aber nicht die Sequenz 5'-CTGG-3' enthält, und
- d) Nachweisen der durch die DNA-Spaltung erhaltenen DNA-Fragmente.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei nach Schritt a) der Schritt

- a') Zugabe von Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten DNA-Oligonukleotiden, wobei ein erstes DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die die -786-Position des *eNOS*-Gens umfasst und dem Sense- oder Antisense-Strang entspricht und zur -786 C-Variante des *eNOS*-Genpromotors komplementär ist, und ein zweites DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die dem Sense- oder Antisense-Strang entspricht, wobei das 3'-Ende des zweiten DNA-Oligonukleotids 1-5 Nukleotide stromaufwärts vom 5'-Ende des ersten DNA-Oligonukleotids liegt, wenn die Sequenzen der DNA-Oligonukleotide dem Sense-Strang entsprechen, und wobei das 5'-Ende des zweiten DNA-Oligonukleotids 1-5 Nukleotide stromaufwärts vom 3'-Ende des ersten DNA-Oligonukleotids liegt, wenn die Sequenzen der DNA-Oligonukleotide dem Antisense-Strang entsprechen, eingefügt wird und an Stelle von Schritt c) und d) der Schritt
- e) Nachweis der -786 C- oder -786 T-Variante mittels einer Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-(FRET)-gestützten DNA-Schmelzkurven-Analyse durchgeführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, wobei die DNA-Oligonukleotide in Schritt a) Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 35 und 36 oder 56 und 57 aufweisen.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, wobei die Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten DNA-Oligonukleotide in Schritt a') Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 37 und 38 oder SEQ ID NO: 58 und 59 aufweisen.

8. Verfahren nach Anspruch 4 oder 6, wobei das Restriktionsenzym *HpaII* ist.

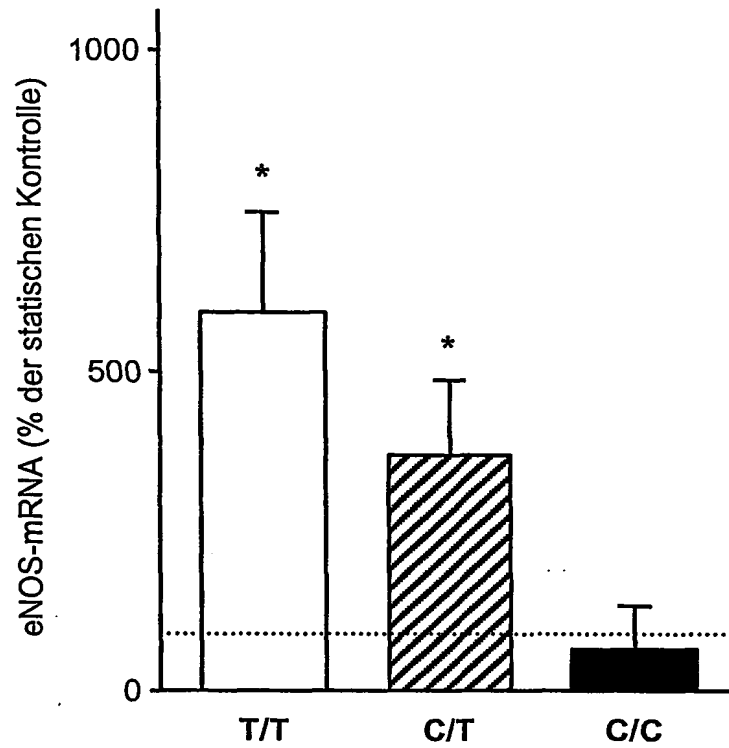
9. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 4 bis 8, umfassend DNA-Oligonukleotide, wobei ein DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromaufwärts der -786-Position dem Sense-Strang des eNOS-Gens entspricht und ein weiteres DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die stromabwärts der -786-Position dem Antisense-Strang des eNOS-Gens entspricht, gegebenenfalls Fluoreszenzfarbstoff-modifizierte DNA-Oligonukleotide, wobei ein erstes DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die die -786-Position des eNOS-Gens umfasst und dem Sense- oder Antisense-Strang entspricht und zur -786 C-Variante des eNOS-Genpromotors komplementär ist, und ein zweites DNA-Oligonukleotid eine Sequenz aufweist, die dem Sense- oder Antisense-Strang entspricht, wobei das 3'-Ende des zweiten DNA-Oligonukleotids 1-5 Nukleotide stromaufwärts vom 5'-Ende des ersten DNA-Oligonukleotids liegt, wenn die Sequenzen der DNA-Oligonukleotide dem Sense-Strang entsprechen, und wobei das 5'-Ende des zweiten DNA-Oligonukleotids 1-5 Nukleotide stromaufwärts vom 3'-Ende des ersten DNA-Oligonukleotids liegt, wenn die Sequenzen der DNA-Oligonukleotide dem Antisense-Strang entsprechen, Reagenzien zur Durchführung einer PCR und entweder ein Restriktionsenzym, das eine Erkennungssequenz aufweist, die mindestens 4 Nukleotide lang ist und die Sequenz 5'-CCGG-3' aber nicht die Sequenz 5'-CTGG-3' enthält und Reagenzien zur Durchführung einer DNA-Spaltung, oder Reagenzien zur Durchführung einer Fluoreszenzresonanz-Energietransfer-(FRET)-gestützten DNA-Schmelzkurven-Analyse.
10. DNA-Oligonukleotide mit einer Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 35 bis 40 sowie 56 bis 61.

Abbildung 1

-871 CTGGTGTACCCACCTGCATTCTGGGAACTGTAGTTTCCCTAGTCCCCCA
STAT T
-821 TGCTCCCACCAGGGCATCAAGCTCTTCCCTGGCCGGCTGACCCTGCCTCA
-786 c-Jun

Abbildung 2

A



B

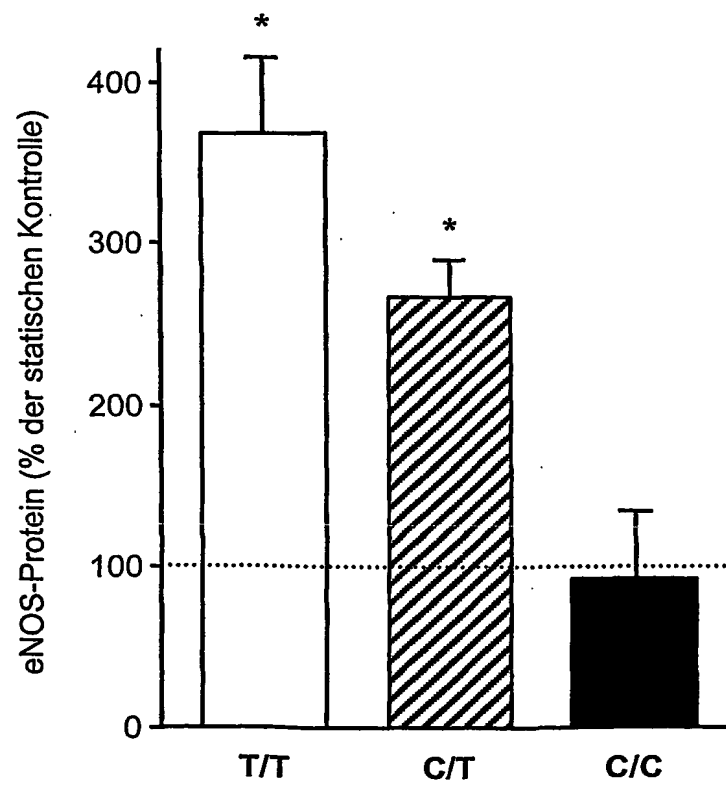


Abbildung 3

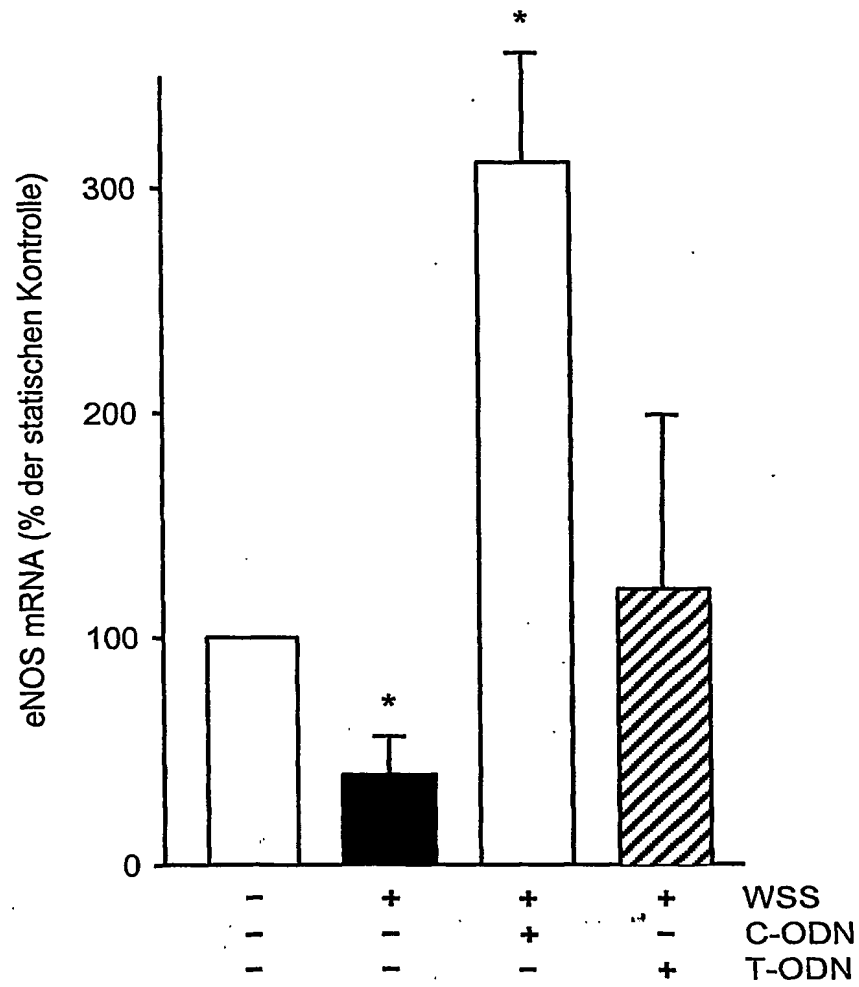


Abbildung 4

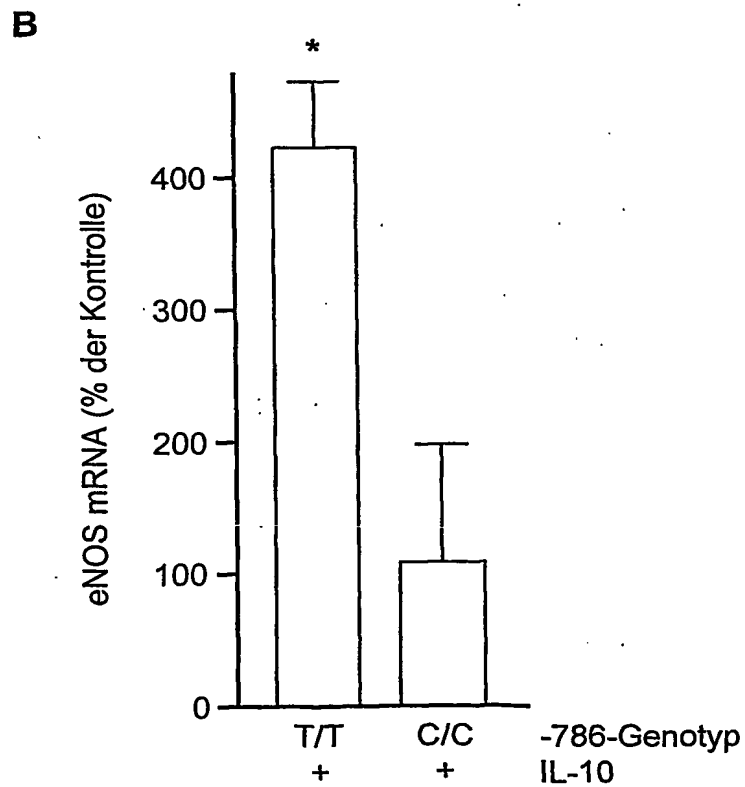
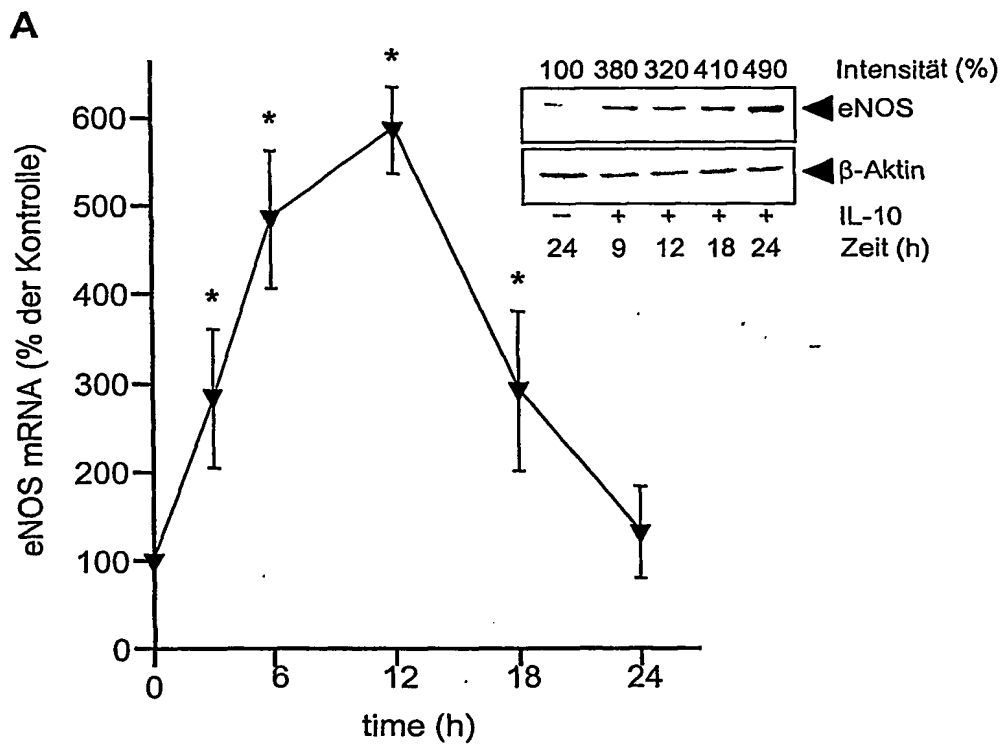


Abbildung 5

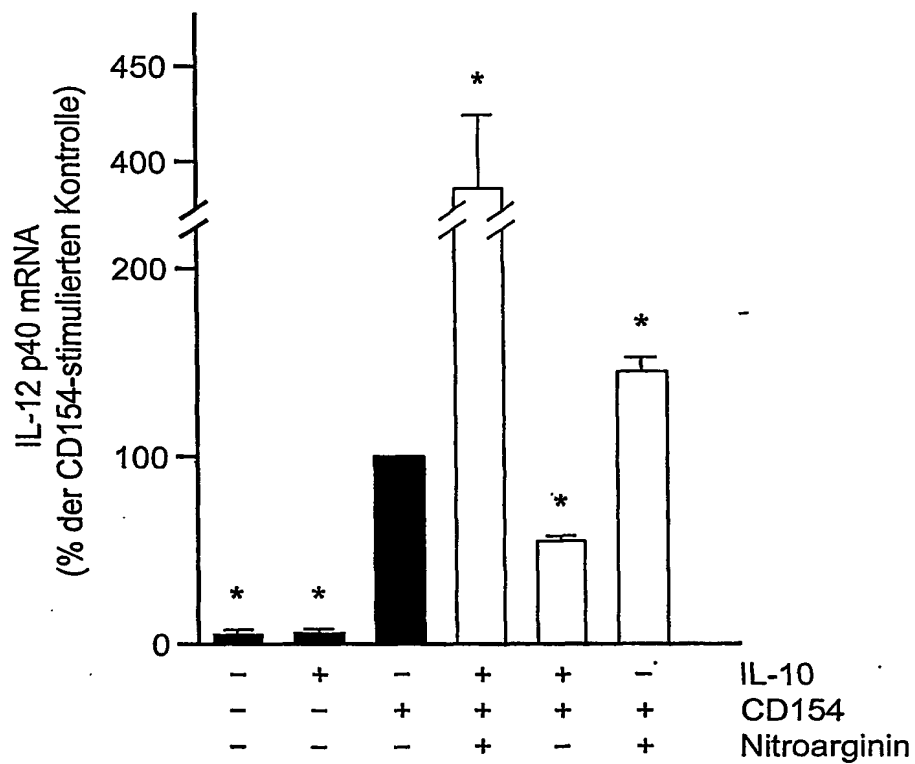
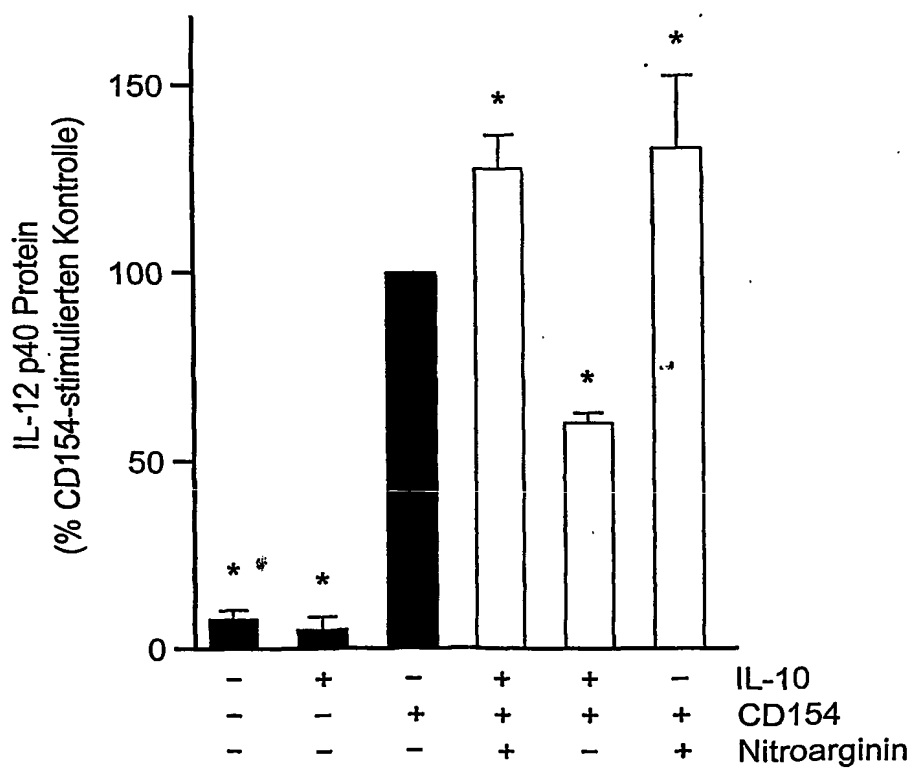
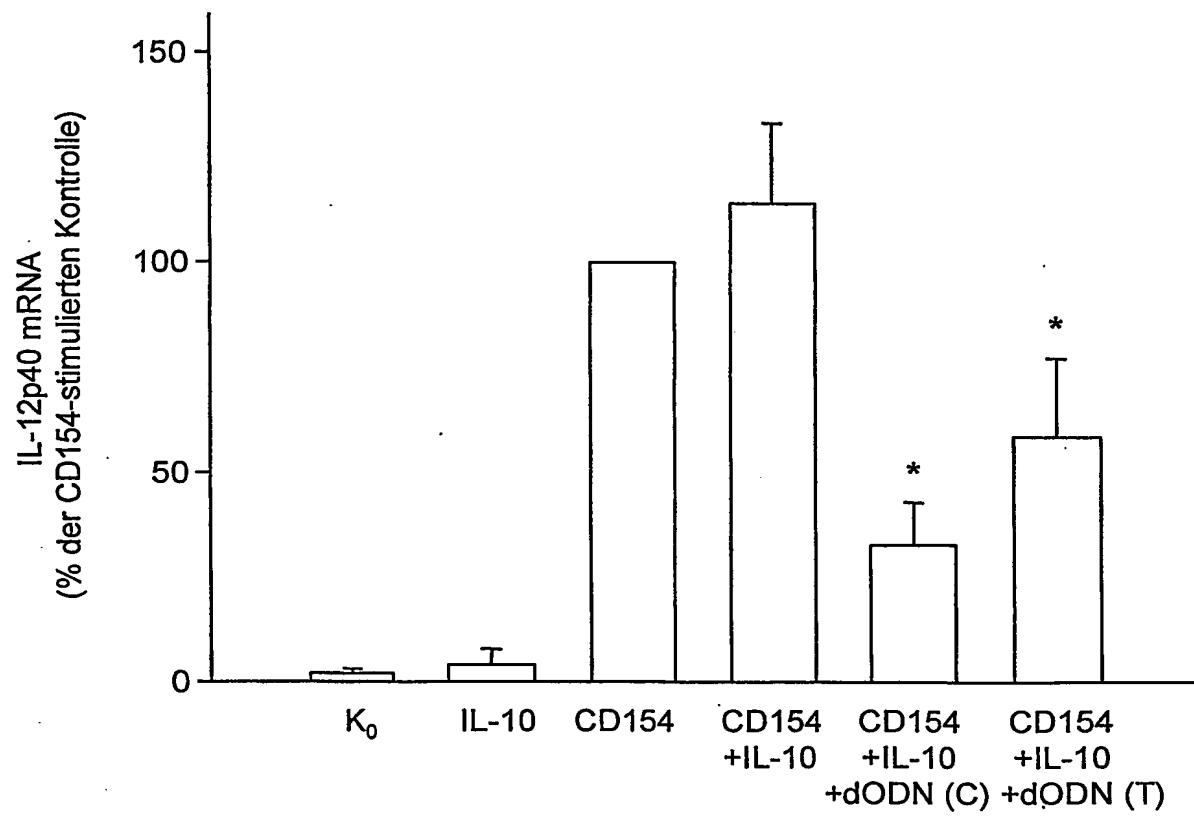
A**B**

Abbildung 6



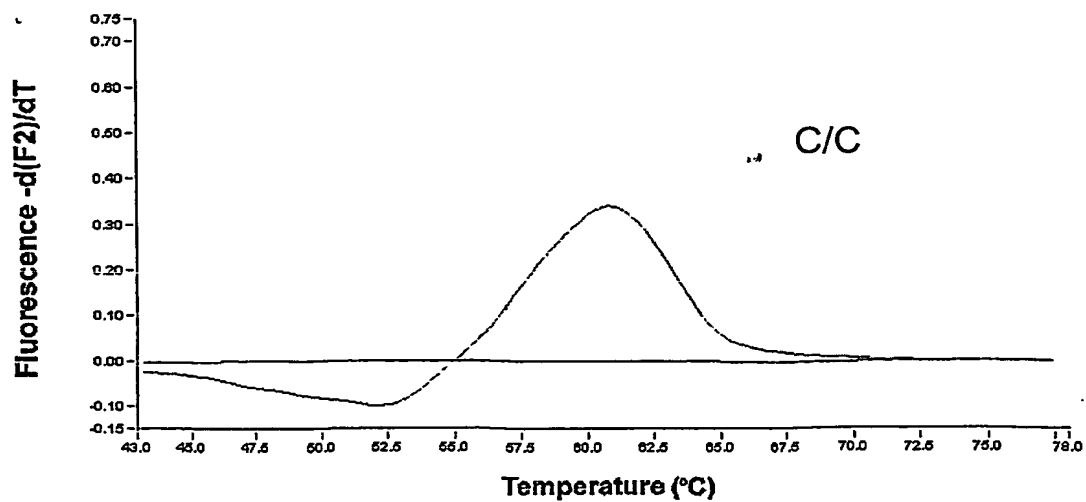
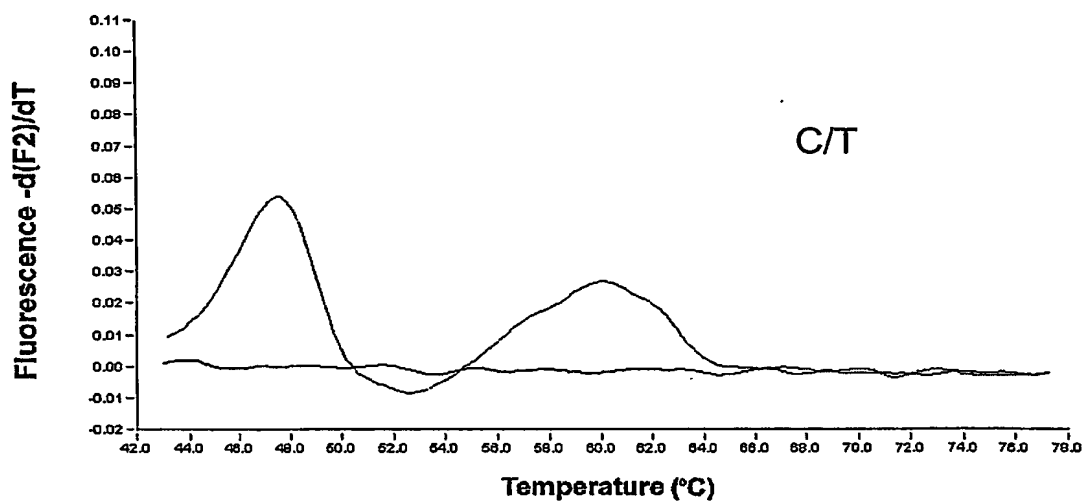
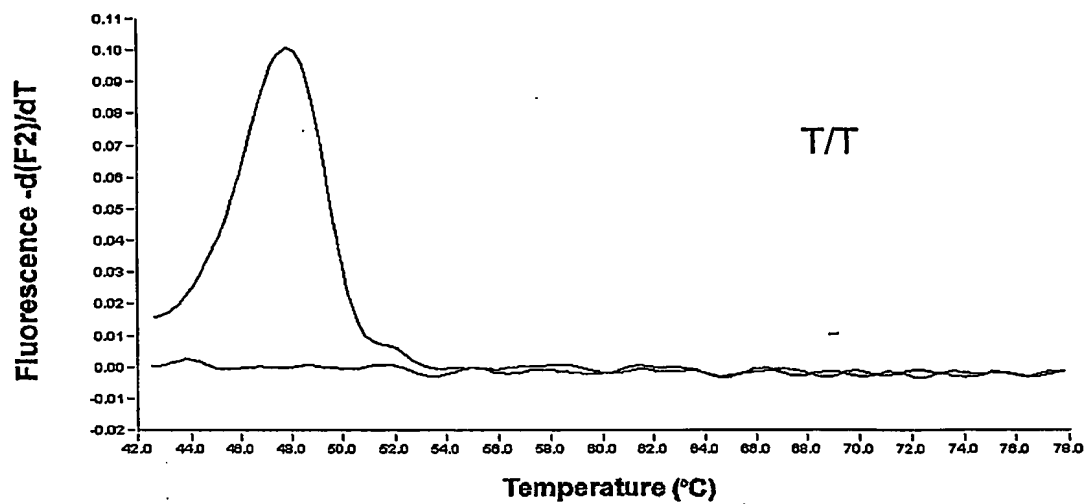
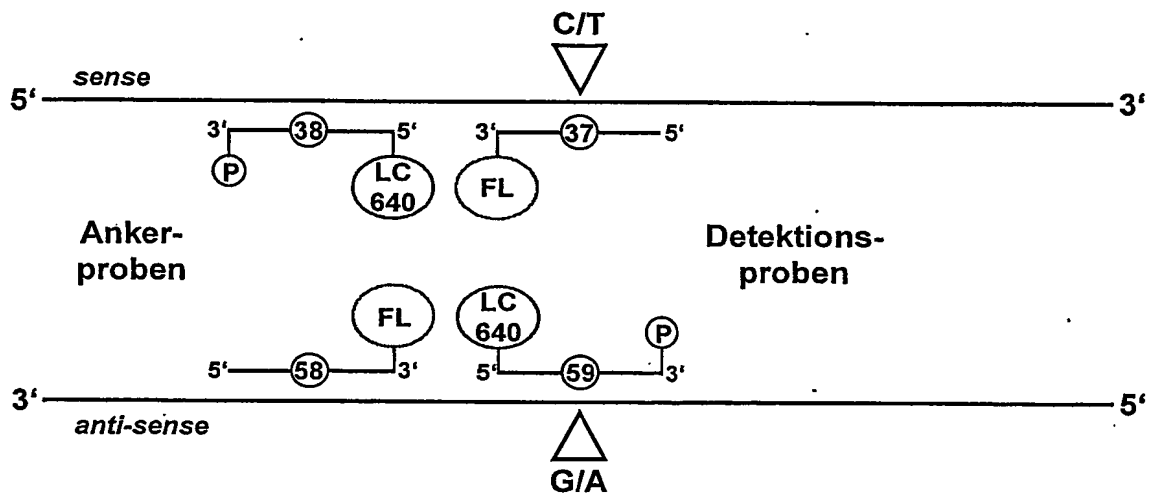


Abbildung 8



SEQUENCE LISTING

<110> Avontec GmbH

5 <120> Funktionelle Korrektur der -786C/T-Varianz des humanen eNOS-Gens

<130> HEC-008 PCT

<140> unknown

10 <141> 2003-09-12

<150> DE 102 42 319

<151> 2002-09-12

15 <160> 63

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 1

agctcttccc tggccggtg ac 22

30

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

35

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 2

40 gtcagccggc cagggaagag ct 22

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

10 <400> 3
agctcttccc tggctggctg ac 22

<210> 4
15 <211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 4
gtcagccagc cagggaagag ct 22

25
<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
30
<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 5
35 cttccctggc cggctgaccc tgc 23

<210> 6
<211> 23
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

5 <400> 6

gcagggtcag ccggccaggg aag

23

<210> 7

10 <211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 7

cttccctggc tggctgaccc tgc

23

20

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 8

30 gcagggtcag ccagccaggg aag

23

<210> 9

<211> 19

35 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

40

<400> 9

gctcttccct ggccggctg

19

<210> 10

5 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 10

cagccggcca gggaagagc

19

15

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 11

25 caagctcttc cctggccgg

19

<210> 12

<211> 19

30 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

35

<400> 12

ccggccaggg aagagcttg

19

40 <210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 13

tcttccctgg ccggctgac

19

10

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 14

20 gtcagccggc cagggaaga

19

<210> 15

<211> 19

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

30

<400> 15

ctggccggct gaccctgcc

19

35 <210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40 <220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 16

ggcagggtca gccggccag

19

5

<210> 17

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 17

15 tccctggccg gctgac .

16

<210> 18

<211> 16

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

25

<400> 18

gtcagtcggc caggga

16

30 <210> 19

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

35 <220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 19

ctggccggct

10

40

<210> 20
<211> 10
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
5
<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 20
10 agccggccag 10

<210> 21
<211> 10
15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide
20
<400> 21
ctggctggct 10

<210> 22
<211> 10
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 22
agccagccag 10
35

<210> 23
<211> 16
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Y=c or t

10 <400> 23

tccctggcyyg gctgac

16

<210> 24

15 <211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Decoy-Oligonucleotide

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

25 <223> R=a or g

<400> 24

gtcagccrgc cagggga

16

30

<210> 25

<211> 13

<212> DNA

35 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

40 <220>

<221> misc_feature

<222> (6) .. (6)

<223> Y=c or t

5 <400> 25
ctggcyggct gac

13

10 <210> 26
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (8) .. (8)
<223> R=a or g

25 <400> 26
gtcagccrgc cag

13

30 <210>` 27
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (6) .. (7)
<223> B=g or t or c

40 <220>

10

<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> B=g or t or c

5

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(9)
<223> Y=c or t

10

<400> 27
tccctbbcyg bctgac

16

15

<210> 28
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

25

<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> V=g or c or a

30

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> V=g or c or a

35

<220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> R=a or g

40

<400> 28
gtcagvcrgv vagggga

16

5 <210> 29
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature

15 <222> (5)..(6)
<223> B=g or t or c

<220>
20 <221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> B=g or t or c

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> Y= c or t

30 <400> 29
ccctbbcygb ctg

35 <210> 30
<211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

13

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(4)
5 <223> V=g or c or a

<220>
<221> misc_feature
10 <222> (8)..(9)
<223> V=g or c or a

<220>
15 <221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> R=a or g

20 <400> 30
cagvcrgvva ggg

13

<210> 31
25 <211> 13
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Decoy-Oligonucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
35 <223> B=g or t or c

<220>
<221> misc_feature
40 <222> (8)..(8)
<223> B=g or t or c

<220>
<221> misc_feature
5 <222> (6)..(6)
<223> Y=c or t

<400> 31
10 ctbbcygbct gac

<210> 32
<211> 13
15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide
20

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> V=g or c or a
25

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
30 <223> V=g or c or a

<220>
<221> misc_feature
35 <222> (8)..(8)
<223> R=a or g

<400> 32
40 gtcagvcrgv vag

13

13

<210> 33
<211> 10
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(4)
<223> B=g or t or c

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (8)..(8)
<223> B=g or t or c

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
25 <223> Y=c or t

<400> 33
ctbbcygbct

30

<210> 34
<211> 10
<212> DNA
35 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

40 <220>
<221> misc_feature

15

<222> (3) .. (3)

<223> V=g or c or a

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (7) .. (8)

<223> V=g or c or a

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (5) .. (5)

<223> R=a or g

15

<400> 34

agvcrgvvag

10

20

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 35

30 gagtctggcc aacacaaatc c

21

<210> 36

<211> 21

35 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

40

<400> 36

16

gacctctagg gtcatgcagg t

21

<210> 37

5 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> DNA Oligonucleotide

<400> 37

gggtcagccg gccagggaa

19

15

<210> 38

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> DNA Oligonucleotide

<400> 38

25 agcttgatgc cctgggtggga g

21

<210> 39

<211> 18

30 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

35

<400> 39

ggaacctgtg tgaccctc

18

40 <210> 40

<211> 18

17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Primer

<400> 40

ccacgtcata ctcaccca

18

10

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Primer

<400> 41

20 gtactccaca ttctacttc t

21

<210> 42

<211> 22

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

30

<400> 42

tttgggtcta ttccgttg tg

22

35 <210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40 <220>

<223> Primer

<400> 43

ggacacccat cccaaatcag tc

22

5

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Primer

<400> 44

15 cacggtgaaa tactgcctgg tg

22

<210> 45

<211> 19

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

25

<400> 45

tcaccatcct ccaggagcg

19

30 <210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

35 <220>

<223> Primer

<400> 46

ctgcttcacc accttcttga

20

40

<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
5
<220>
<223> Primer

<400> 47
10 gttcatccgg caccagtcag 20

<210> 48
<211> 21
15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer
20

<400> 48
acgtgcacat gagctgccta c 21

25 <210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 49
cctgcattct gggaactgta g 21
35

<210> 50
<211> 21
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 50

5 cctgtatgcc gtgagctata g

21

<210> 51

<211> 19

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

15

<400> 51

gccggctgac cctgcctca

19

20 <210> 52

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 52

tcttccctag ctgactgac

19

30

<210> 53

<211> 16

<212> DNA

35 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Decoy-Oligonucleotide

40 <400> 53

tccctgaccg actcag

16

5 <210> 54
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

<400> 54
tccctagctg actgac 16

15 <210> 55
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Decoy-Oligonucleotide

25 <400> 55
gtgcatttcc cgtaaattctt gtctaca 27

30 <210> 56
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

35 <400> 56 4
ctgggaactg tagtttccct ag 22

40 <210> 57
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

5

<400> 57

accctgtcat tcagtgacgc ac

22

10

<210> 58

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> DNA Oligonucleotide

<400> 58

gctcccacca gggcatcaag ct

22

20

<210> 59

<211> 16

<212> DNA

25

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA Oligonucleotide

30

<400> 59

ttccctggcc ggctga

16

35

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Primer

<400> 60

ggatgtggct gtctgcatgg ac

22

5 <210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10 <220>

<223> Primer

<400> 61

tggtccacga tggtgacttt gg

22

15

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

25 <400> 62

gaccacagtc catgccatca ctgc

24

<210> 63

30 <211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

35 <223> Primer

<400> 63

atgaccttgc ccacagcctt gg

22

40